

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Laurea Magistrale in Chimica Industriale

Classe LM 71 – Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

***Design e sintesi di nuove sonde luminescenti
per il "targeting" dell'avidina***

Tesi di Laurea Sperimentale

Presentata da:

Maria Chiara Vaccari

Relatore:

Dr.ssa Letizia Sambri

Correlatori:

Dr. Stefano Stagni

Dr. Andrea Baschieri

III Sessione

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

<u>ABSTRACT</u>	pag 1
1. <u>INTRODUZIONE</u>	pag 3
1.1 Imaging biomedico	
1.2 Marcatori luminescenti per la bioconiugazione	
1.3 Fluorofori organici	
1.4 Fluorofori organometallici	
1.5 Risultati raggiunti precedentemente dal gruppo di ricerca	
2. <u>SCOPO DELLA TESI</u>	pag 13
3. <u>RISULTATI E DISCUSSIONE</u>	pag 14
3.1 PREPARAZIONE DEI LEGANTI L1, L2, L3, L4	
3.1.1 Sintesi del legante L1	
3.1.2 Sintesi del legante L2	
3.1.3 Sintesi del legante L3	
3.1.4 Sintesi del legante L4	
3.2 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI A, B,C, D	
3.3 STUDIO DELLE PROPRIETÀ FOTOFISCHE DEI COMPLESSI	
3.3.1 Spettri di assorbimento ed emissione	
3.3.2 Interazione avidina-complessi A, B, C, D	
3.3.3 Saggi con il colorante HABA	
4. <u>CONCLUSIONI</u>	pag 36

5. PARTE SPERIMENTALE.....pag 37

5.1 Preparazione del complesso A

5.1.1 Sintesi della 4-azidoanilina

5.1.2 Sintesi del 4-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)anilina

5.1.3 Sintesi del legante L1

5.1.4 Sintesi del complesso A

5.2 Preparazione del complesso B

5.2.1 Sintesi del 2-(1-(4-bromofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina

5.2.2 Sintesi della 4'-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-[1,1'-bifenil]-4-ammina

5.2.3 Sintesi del legante L2

5.2.4 Sintesi del complesso B

5.3 Preparazione del complesso C

5.3.1 Sintesi del 4-azidofenolo

5.3.2 Sintesi del 4-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenolo

5.3.3 Sintesi del legante L3.

5.3.4 Sintesi del complesso C

5.4 Preparazione del complesso D

5.4.1 Sintesi del 4'-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-[1,1'-bifenil]-4-ol

5.4.2 Sintesi del legante L4

5.4.3 Sintesi del complesso D

5.5 Titolazioni in emissione

5.6 Saggio mediante l'utilizzo del colorante HABA

6. BIBLIOGRAFIA.....pag 50

7. RINGRAZIAMENTI.....pag 52

ABSTRACT

Recent studies on the use of bio-conjugating organometallic probes report on the possibility to use biotinylated-derivatives to selectively coordinate to a specific protein, avidin.

In the present thesis, the synthesis of four new bifunctional ligands is described. The ligands contain both a pyridine triazolic unit able to coordinate a transition metal, and a biotin fragment able to bond avidin: the two functionalities are linked together by an appropriate aromatic linker (amide or ester).

The obtained ligands were then employed to form luminescent Ir(III) complexes, that have been fully characterized also by a photophysical point of view both in organic and in aqueous solvent. Therefore, titrations of solutions of avidin with aqueous solutions of Ir(III)-complexes have been performed in order to estimate the luminescence variations of the complexes in the presence or in the absence of bio-conjugation.

1. INTRODUZIONE

1.1 Imaging biomedico

Con il termine *imaging biomedico* ci si riferisce ad un generico processo che permette di acquisire, in maniera non invasiva, immagini di un campione target contenuto all'interno di un organismo vivente. Immagini di questo tipo possono essere ottenute per scopi clinici per individuare, diagnosticare e studiare una malattia, oppure per scopi scientifici legati allo studio dell'anatomia e della fisiologia degli organismi studiati. *L'imaging biomedico* comprende svariate tecniche di analisi quali la radiologia, la medicina nucleare, l'endoscopia, la termografia e la microscopia.

Negli ultimi anni, grazie alla scoperta di nuovi agenti di contrasto altamente selettivi verso determinati target biologici, si è potuta migliorare la sensibilità e l'efficienza delle tecniche di indagine non invasive.¹

Tali tecniche possono essere suddivise in gruppi in base al tipo di energia che sfruttano (raggi X, positroni, fotoni, onde radio), in base alla risoluzione spaziale che sono in grado di raggiungere (macroscopia, mesoscopia, microscopia) o in base alle informazioni che permettono di ottenere (anatomiche, fisiologiche, cellulari, molecolari). Esse sono, più che competitive, complementari tra di loro e la scelta dell'una piuttosto dell'altra deve essere eseguita in base alle analisi che vengono richieste per il campione in esame.¹

I sistemi di *imaging* macroscopico che forniscono informazioni di tipo anatomico e fisiologico sono già ampiamente sfruttate in ambito clinico. Tali sistemi includono la Tomografia Computerizzata (CT), la Risonanza Magnetica (MR) e gli ultrasuoni. Al contrario, i sistemi che permettono di ottenere informazioni molecolari stanno ancora emergendo e vengono raramente usati in ambito clinico: essi includono Tomografia per Emissione di Positroni (PET), la Tomografia Computerizzata ad Emissione di Singoli Fotoni (SPECT), la fluorescenza in riflettenza e l'*imaging* mediante bioluminescenza.

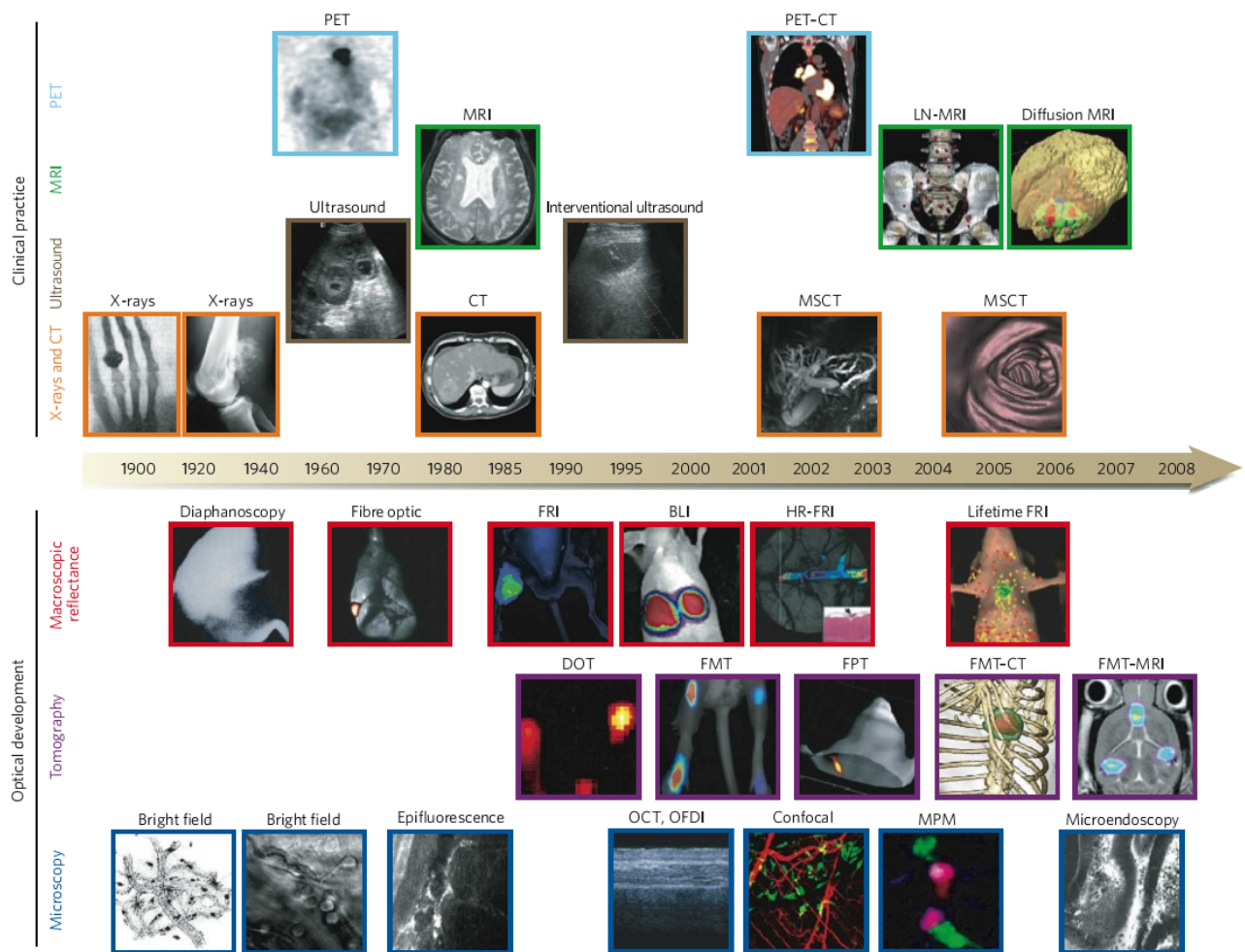


Figura 1: Tecniche di imaging biomedico su scala temporale.

L'*imaging* su campioni biologici, sia in vivo che in vitro, è stato per parecchi anni svolto mediante microscopia ottica (*imaging* ottico di fluorescenza e fosforescenza) che sfrutta diversi effetti dell'interazione della luce con i tessuti e che tutt'ora viene utilizzata anche al fine di migliorare le tecniche attualmente in uso.¹ La radiazione elettromagnetica nel campo Vis-NIR, in particolare, è estremamente utile nell'*imaging*, in quanto non è dannosa ed è in grado di creare un netto contrasto di colore, ed in più permette di fare studi di dinamica molecolare nella scala dei microsecondi, polarizzando la sorgente di eccitazione.

Tra le tecniche di *imaging* ottico disponibili, la microscopia in fluorescenza è risultata una delle più potenti, perché consente di osservare la luminescenza del campione con una migliore risoluzione.^{2,3}

Le tecniche di *imaging* ottico difficilmente sfruttano la fluorescenza intrinseca al campione biologico, ma fanno uso di composti luminescenti, solitamente composti organici o complessi organo-metallici.¹

Nelle applicazioni di *imaging* ottico l'energia proveniente da una sorgente esterna di luce UV o Vis è assorbita da un agente di contrasto iniettato vicino alla zona di tessuto da monitorare e, quasi immediatamente, la luce viene emessa ad una lunghezza d'onda maggiore che viene rilevata selettivamente dal detector.

Le tecniche di *imaging* di fluorescenza avanzate, come la Tomografia Molecolare in Fluorescenza (FMT) e l'*Imaging* di Riflettanza in Fluorescenza Libera (FRI), impiegano comunemente lunghezze d'onda nel vicino infrarosso e, recentemente, sono state impiegate per applicazioni di *imaging* molecolare in vivo.¹

1.2 Marcatori luminescenti per la bioconiugazione.

Negli ultimi anni, l'importanza dei coloranti luminescenti per la determinazione qualitativa e quantitativa di analiti è notevolmente cresciuta.

Il processo di coniugazione fra una sonda molecolare e un determinato recettore biologico consiste nell'interazione di un opportuno gruppo funzionale presente sul fluoroforo con un gruppo recettore presente sull'analita da evidenziare. A causa della complessità dei sistemi trattati, garantire la selettività di questa reazione è molto difficile. Normalmente questo problema viene affrontato in tre modi:

- 1- Funzionalizzazione dei fluorofori: il fluoroforo viene funzionalizzato con un gruppo capace di reagire soltanto con il recettore desiderato; ad esempio le funzioni maleimmide reagiscono principalmente con i solfuri;
- 2- sfruttando la via del metabolismo. Questa tecnica, molto usata nell'*imaging* cellulare, consiste nell'equipaggiare la sonda con una molecola come il glucosio, che entrando nei cicli cellulari, porterà il fluoroforo ad accumularsi in determinati organelli e non in altri;
- 3- utilizzare il cosiddetto approccio “chiave - serratura” messo in atto dagli enzimi. Ciò consiste nello sfruttare le particolari affinità biologiche che hanno alcune proteine verso determinate molecole organiche. Uno svantaggio di questo metodo è che il fluoroforo legato a quella molecola-“chiave” è affine solo per quella determinata proteina-“serratura”.

Risulta inoltre fondamentale che il fluoroforo sia in grado di legarsi al target desiderato mantenendo intatte le sue capacità emissive a seguito della coordinazione. Quindi è spesso necessario distanziare i gruppi responsabili dell'emissione e della coordinazione mediante l'impiego di opportuni spaziatori per limitare al minimo le interazioni tra biomolecola e marcatore.

I marcatori luminescenti sono largamente impiegati in campo bioanalitico per studi sugli acidi nucleici, nei saggi immunochimici, in chimica clinica e nello studio delle interazioni proteina-ligando.⁴

Le sonde marcate con i fluorofori vengono rivelate mediante misure spettroscopiche alle lunghezze d'onda di assorbimento e di emissione tipiche del fluoroforo stesso. La sensibilità ottenuta con un marcatore fluorescente è direttamente proporzionale al coefficiente di estinzione molare e alla resa quantica di fluorescenza. I fluorofori organici possono presentare valori del coefficiente di estinzione (ϵ) fino a $\approx 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e rese quantiche percentuali prossime al 100%.

Per essere efficienti le sonde luminescenti devono possedere caratteristiche essenziali per la rivelazione dell'analita. Innanzitutto, è fondamentale che i valori delle lunghezza d'onda relativi ai massimi di assorbimento e di emissione del colorante cadano in una regione dello spettro in cui siano minimi i fenomeni di interferenza con la matrice biologica. Questo parametro condiziona in modo significativo la sensibilità della rivelazione. E' infatti importante ricordare che l'autofluorescenza delle molecole biologiche, oltre ad essere difficilmente rivelabile e correlabile alla concentrazione della biomolecola stessa, genera un segnale di fondo che può andare a compromettere la sensibilità della rivelazione del segnale di luminescenza del marker.

Inoltre, è necessario minimizzare il fenomeno dello scattering, effetto che influisce fortemente sulla sensibilità del metodo e che deriva principalmente dalla presenza di proteine ed altre macromolecole in campioni di origine biologica, come ad esempio il siero. È da porre in rilievo come i fenomeni di autofluorescenza e scattering risultano particolarmente evidenti nella regione visibile dello spettro.

Alla luce dei fattori elencati, risulta importante scegliere una classe di fluorofori le cui caratteristiche spettrali possano essere modulate facilmente mediante piccole variazioni strutturali, siano fotochimicamente stabili, possiedano un elevato valore di resa quantica, non diano legami specifici con le altre molecole presenti nel campione e siano

solubili nel solvente in cui si effettuato il processo di coniugazione. Inoltre la solubilità è un fattore cruciale anche per prevenire fenomeni di auto-aggregazione che diminuirebbero le rese quantiche di luminescenza.

1.3 Fluorofori organici

Con il termine *fluoroforo* si indica un composto chimico fluorescente che è in grado di emettere luce dopo aver assorbito fotoni ad una certa lunghezza d'onda. La struttura tipica del fluorofori prevede la presenza di ampi sistemi coniugati.

Degli oltre 2000 coloranti organici descritti nel Color Index, meno di 200 sono fluorescenti. Di questi la maggioranza appartiene a due classi: i derivati dello xantene e quelli delle fenazina di cui i derivati dello xantene sono il gruppo più numeroso. Questi composti sono caratterizzati da tre anelli aromatici legati ad un atomo di carbonio a ponte ibridato sp^2 . L'estesa delocalizzazione e la coplanarità della struttura conferiscono a queste molecole ottime proprietà fotofisiche, come alti coefficienti di estinzione molare (vicini a $80000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e rese quantiche prossime al 100%. In questa classe, la fluoresceina, la rodamina e i loro derivati rivestono un particolare interesse teorico e applicativo.

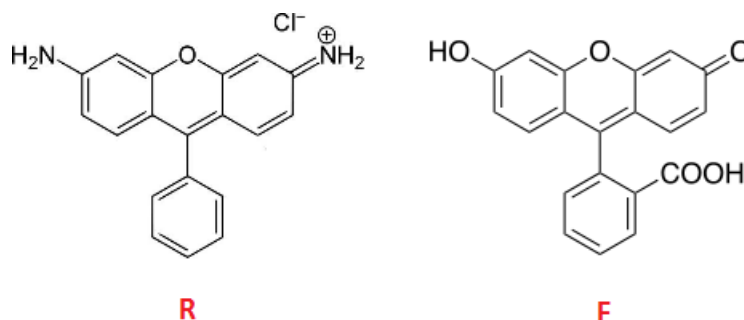


Figura 2: Struttura base della Rodamina (R) e della Fluoroscceina (F).

Tuttavia rispetto ad altri derivati dello xantene, queste presentano un ponte etereo che lega tra loro due dei tre anelli aromatici,⁵ e questa caratteristica strutturale rende lo spettro di queste molecole molto sensibile al pH: ciò permette a questi fluorofori di essere utilizzati come indicatori di pH, ma ne limita l'uso come marker da utilizzare in vivo o in vitro su matrici cellulari in cui si trovano compartimenti a diversi pH.

In termini generali per utilizzare un fluoroforo organico come un marcatore luminescente è necessario modificarne la struttura con gruppi capaci di legarsi alle funzioni amminiche e tioliche presenti nello specifico target biologico.⁶

Questi gruppi oltre a permettere la bioconiugazione fra il marcatore e il target, possono alterare le proprietà fisiche e fotofisiche della sonda luminescente, permettendo:

- di regolare le λ di assorbimento ed emissione;
- di migliorare la solubilità in acqua;
- di diminuire la dipendenza delle proprietà fotofisiche dall'ambiente;
- di aumentare la stabilità di queste molecole nell'ambiente biologico.

La facilità con cui queste molecole possono essere modificate ha generato una grande varietà di fluorofori utilizzabili come marcatori biologici. Per decidere quale tipo di fluoroforo è meglio utilizzare bisogna considerare che la lunghezza d'onda, la resa quantica, il tempo di risposta e l'energia emessa non dipendono strettamente dal colorante, ma sono in gran parte legate al modo in cui lo stato eccitato della molecola interagisce con l'ambiente circostante.

Il parametro fisico che maggiormente viene preso in considerazione per questa scelta è l'energia necessaria per eccitare la molecola, ossia la lunghezza d'onda di eccitazione perché definisce la zona spettrale dove la molecola andrà a emettere, dato che la banda di emissione cade su lunghezze d'onda più alte di quelle della sorgente di eccitazione.

Nonostante i fluorofori organici siano comunemente utilizzati nell'*imaging* biologico per via della loro versatilità strutturale, queste molecole presentano una serie di limitazioni. In primo luogo non sono utilizzabili per lunghi periodi di osservazione del tessuto biologico a causa della loro fotodegradazione relativamente veloce, risultato della loro reazione con l'ossigeno molecolare disciolto nel mezzo, quando sono allo stato eccitato. A ciò si aggiunge il fatto che la maggior parte dei fluorofori organici ha una banda di emissione relativamente larga che può facilmente sovrapporsi a quella di altri fluorofori. Inoltre, ciascun fluoroforo può essere ottimamente eccitato solo a una ben determinata lunghezza d'onda, quindi i fluorofori organici non sono utilizzabili per imaging multicolore.

Infine l'emissione di fluorescenza dei coloranti organici può a volte sovrapporsi all'autofluorescenza dei tessuti. Questo è vero per la maggior parte dei coloranti organici, come fluoresceina e rodamina, la cui emissione di fluorescenza cade nel

campo visibile. I fluorofori organici presentano anche un altro svantaggio, quello di avere tempi di vita brevi, dell'ordine di alcuni nanosecondi.

Più recentemente è stata sviluppata una nuova classe di agenti di contrasto in grado di superare le limitazioni dei fluorofori organici: i complessi dei lantanidi e dei metalli di transizione chelati.

1.4 Fluorofori organometallici

I lantanidi mostrano luminescenza nelle soluzioni acquose e tempi di decadimento compresi tra 0.5 e 3 ms.^{7,8} A causa del loro debole assorbimento essi vengono utilizzati sotto forma di metalli chelati da leganti organici e mostrano emissioni del tipo LMCT (Ligand to Metal Charge Transfer). Questi complessi sono stati ampiamente usati per rilevazioni ad alta sensibilità in campioni biologici:⁹ infatti sebbene i campioni biologici mostrino autofluorescenza, questa ha tempi di vita brevi (ordine del nanosecondo) e quindi l'uso dei lantanidi che possiedono stati emittenti a lunga vita permette di effettuare misure risolte nel tempo nelle quali viene minimizzata l'interferenza di fondo e il "*light-scattering*". I complessi di Eu(III) e Tb(III) in particolare hanno emissioni nel visibile e bande strette che si differenziano dall'emissione di fondo (bande larghe che cadono nell'UV) delle molecole biologiche. Per questo motivo sono ampiamente usati come traccianti in immunochimica.

Per quanto attiene ai complessi di metalli di transizione, gli esempi più rappresentativi sono dati da composti coordinativamente saturi in cui il centro metallico è coordinato a leganti chelanti aromatici. In particolare, il composto capostipite è rappresentato da un complesso polipiridinico di Ru(II) quale $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (Figura 3) e dai suoi derivati. Gli studi effettuati su questa classe di complessi hanno costituito la base fondamentale per la loro estensione verso derivati simili contenenti altri metalli di transizione, come ad esempio i complessi ciclometallati di Ir(III) ed i derivati tris-carbonilici di Re(I) (Figura 3).

In particolare, i complessi ciclometallati di Iridio(III) (Figura 3) hanno suscitato negli ultimi anni un interesse sempre crescente, in quanto mostrano ottime caratteristiche in termini di resa quantica e tempi di vita di luminescenza.

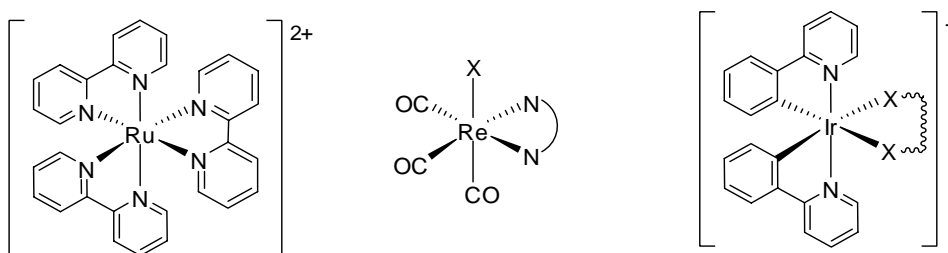


Figura 3: Struttura dei complessi: $[Ru(bpy)_3]^{2+}$, $fac-Re(CO)_3X$ e sistemi ciclometallati di Ir(III). X indica atomi di O, N o S. Il legante X-X non è carico.

Le proprietà luminescenti dei complessi polipiridinici di Ir (III) hanno attratto molto l'attenzione già dallo studio delle caratteristiche emissive del complesso $cis-[Ir(bpy)_2Cl_2]^+$.¹⁰ Da allora numerosi complessi ciclometallati di Ir (III) con formula generale $[Ir(N^{\wedge}C)_2(N^{\wedge}N)]^+$ sono stati sintetizzati e presentano un'intensa banda di emissione nel visibile nella zona fra il blu e il verde, con un lungo tempo di vita.^{11,12}

In tal senso, uno dei primi composti considerati è rappresentato dal complesso $[Ir(ppy)_2(CH_3CN)_2]^+$ che presenta una debole emissione in soluzione acquosa. Quando però questo complesso si trova in presenza di istidina (His) o di proteine con un'alta concentrazione di questo aminoacido, manifesta un'intensa banda di emissione, che presenta un'intensità pari a 180 volte quella del suo analogo in assenza di istidina. La causa di questo fenomeno è dovuta alla formazione di un legame covalente fra il metallo e il gruppo imidazolico dell'amminoacido. La formazione di questo nuovo legame altera la simmetria del sistema e offre al complesso la giusta struttura per valorizzare a pieno le sue caratteristiche fotofisiche.¹³

Questo risultato ha permesso di accedere ad una nuova classe di composti organometallici che in presenza di un determinato target modificano le loro proprietà fotofisiche.

La strategia seguita è quella di sintetizzare molecole organiche polifunzionalizzate, aventi sia unità capaci di formare complessi con opportuni metalli, sia unità, come biotina, estradiolo e glucosio, in grado di coordinare siti specifici di particolari proteine, ormoni o vitamine. In questo modo si ottengono complessi organometallici luminescenti capaci di interagire direttamente con composti target variando le loro proprietà fotoemissive a seconda che la bio-coniugazione sia presente od assente.

Tra le possibili strutture capaci di formare interazioni specifiche con opportuni recettori la biotina riveste una notevole importanza. Questa molecola è una vitamina e viene

utilizzata in molti cicli energetici cellulari come cofattore di decarbossilasi ATP-dipendenti, ma la sua caratteristica più interessante risiede nella sua capacità di formare un'interazione non covalente con una specifica glicoproteina, l'avidina.¹⁴

Un esempio di applicazione della biotina nel campo dei marcatori organometallici viene dalla sintesi di una nuova serie di complessi di iridio polipiridinici ciclometallati (Figura 4); tutte queste molecole hanno in comune un legante bis piridinico a cui è stato attaccato un pendaglio ammidico della biotina. Questi complessi in presenza di avidina mostrano un aumento della risposta di emissione da 1.5 a 3.3 volte rispetto alle intensità misurate in assenza della proteina bersaglio, oltre a presentare un incremento del tempo di vita.¹⁵

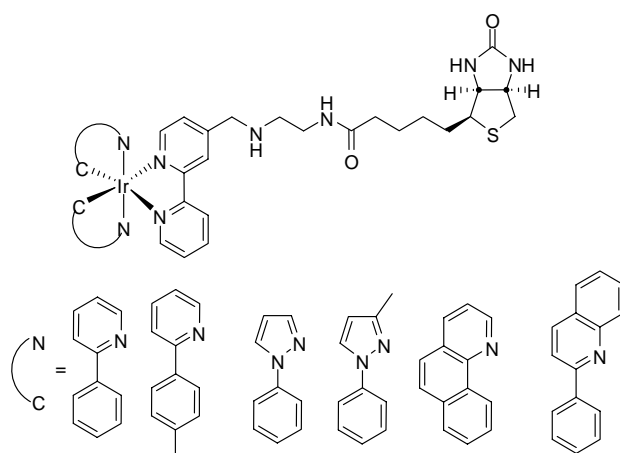


Figura 4: Complessi ciclometallati di Ir (III) funzionalizzati con la biotina.

1.5 Risultati raggiunti precedentemente dal gruppo di ricerca

Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la tesi ha di recente indirizzato la sua attenzione verso un possibile impiego della “*click chemistry*” per la sintesi di molecole organiche capaci di fungere da leganti per lantanidi e metalli di transizione per ottenere complessi organometallici aventi proprietà fotoemissive.

Questi leganti rispetto ai classici sistemi dimminici aromatici presentano una sintesi più semplice e tutti i vantaggi della presenza del gruppo 1,2,3-triazolo:

- grande stabilità ed inerzia chimica, specialmente nei sistemi biologici;
- elevato momento di dipolo;
- possibilità di formare legami a idrogeno e quindi favorire la solubilità del sistema a cui sono vincolati, specialmente in soluzione acquose.

Le caratteristiche appena riassunte rispecchiano alcuni dei requisiti fondamentali che deve possedere un marcatore luminescente.

La progettazione di buoni candidati per le applicazioni nel campo della luminescenza richiede una scelta accurata dei metalli e dei leganti: solamente una combinazione appropriata degli orbitali π dei leganti organici con gli orbitali d del centro metallico porta a transizioni elettroniche che coinvolgono trasferimenti di carica.

Nel corso delle ricerche è stato messo a punto un metodo di sintesi dei leganti piridin-triazolici **1** (5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-ossa-esaidro-1*H*-tieno-[3,4-*d*]imidazol-4-il)-*N*-(11-(4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) undecil)-pentanamamide) e **2** ((11-(4-(piridin-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il) undecil)-5-((3a*S*, 4*S*, 6a*R*)-2-ossa-esaidro-1*H*-tieno-[3,4-*d*]imidazol-4-il) pentanoato), riportati in Figura 5. La differenza fra i due leganti risiede nello spaziatore che collega le due unità funzionali della molecola: un'ammide nel caso di **1** e un estere per **2**.

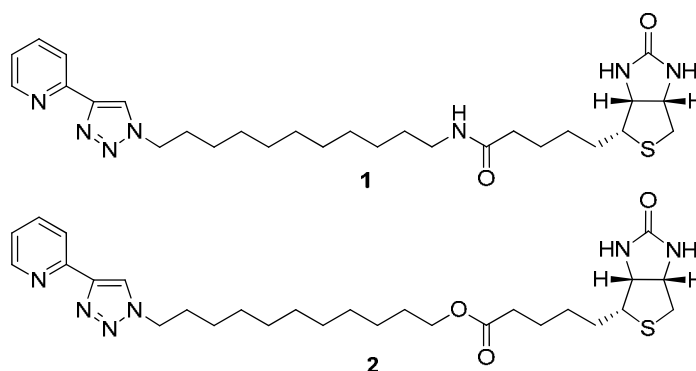


Figura 5: Leganti piridin-triazolici **1** ed **2**.

L'ammide **1** e l'estere **2** sono stati utilizzati come leganti di Ir (III) e Re (I) facendoli reagire con $\text{Ir}_2(\text{bpy})_4\text{Cl}_2$ e $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Br}$, per formare nuovi complessi esacoordinati **3**, **4**, **5** e **6** riportati nella seguente Figura 6.

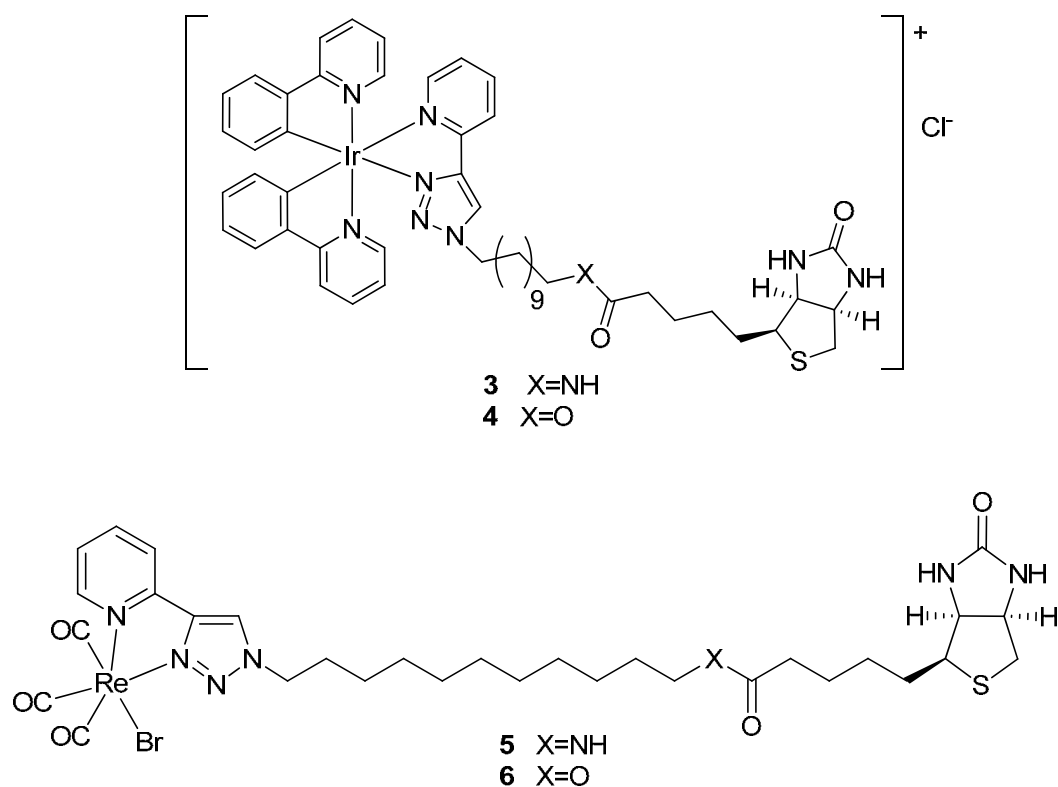


Figura 6: Struttura dei complessi di Ir (III) e Re (I) con leganti piridin triazolici.

Successivamente sono state misurate le proprietà fotofisiche sia in solvente organico che in soluzione acquosa, con lo scopo di indagare l'alterazione delle caratteristiche luminescenti dei complessi con questi leganti piridin-triazolici. Infine soluzioni acquose a titolo noto dei complessi sintetizzati sono state usate per titolare una soluzione di avidina, con il fine di comprendere come le proprietà luminescenti dei sistemi metallo organici sintetizzati variano quando sono coordinati con la proteina in esame.

2. SCOPO DELLA TESI

Durante la mia tesi mi sono occupata della sintesi di quattro leganti bifunzionali (**L1-L4**) contenenti sia un'unità piridin-triazolica capace di fungere da legante per un opportuno metallo, che un'unità di biotina in grado di legarsi all'avidina. Le due unità sono connesse da un ponte rigido e aromatico di natura ammidica (**L1, L2**) o esterea (**L3, L4**).

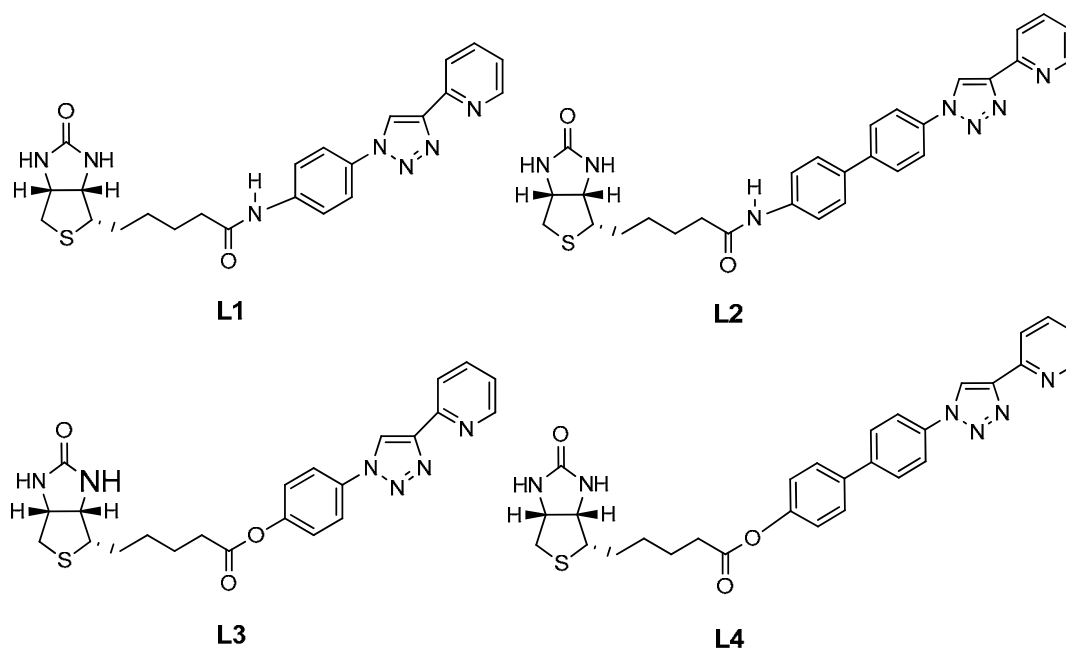


Figura 7: Leganti Piridin-1,2,3-triazolo funzionalizzati con la biotina.

Una volta ottenuti i leganti progettati, sono stati sintetizzati i corrispondenti complessi di Ir (III). Di questi ultimi sono state misurate le proprietà fotofisiche sia in solvente organico che in soluzione di tampone fosfato acquoso. Infine soluzioni di avidina sono state titolate con soluzioni acquose a titolo noto dei complessi sintetizzati per determinare la variazione delle proprietà emissive dei complessi in presenza di bioconiugazione avidina-biotina.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Per poter adempiere agli obiettivi della tesi è stato necessario elaborare la strategia di sintesi dei leganti organici progettati, che contengono sia una parte capace di chelare il metallo, come il 4-piridin-1,2,3-triazolo, sia una parte capace di legarsi selettivamente all'avidina, come la biotina.

I processi di sintesi condotti sono essenzialmente suddivisi in due parti: la prima riguarda la sintesi del legante generico **L**, mentre la seconda la reazione tra quest'ultimo e il dimerico di Iridio riportato in Figura 8 per ottenere il complesso con proprietà luminescenti.

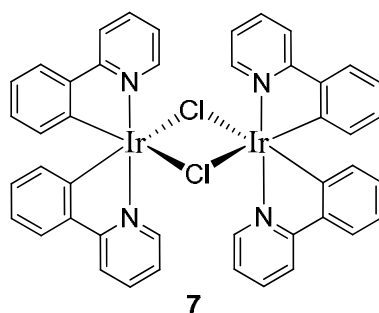


Figura 8: *Dimero di Iridio utilizzato per la sintesi dei complessi luminescenti.*

Le sintesi dei leganti **L1** e **L3** presentano passaggi simili in quanto prevedono entrambe una reazione di Ullmann tra un arilioduro e un'azide, catalizzata da CuI. A questa segue una reazione di cicloadizione di “click” tra un azide e un alchino.

La preparazione dei leganti **L2** e **L4**, invece, parte dalla sintesi di un precursore comune, 2-(1-(4-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina **13**, che successivamente viene fatto reagire con l'opportuno acido boronico.

3.1 PREPARAZIONE DEI LEGANTI **L**₁₋₄

3.1.1 Sintesi del legante **L1**

La sintesi di **L1** è indicata nello schema seguente:

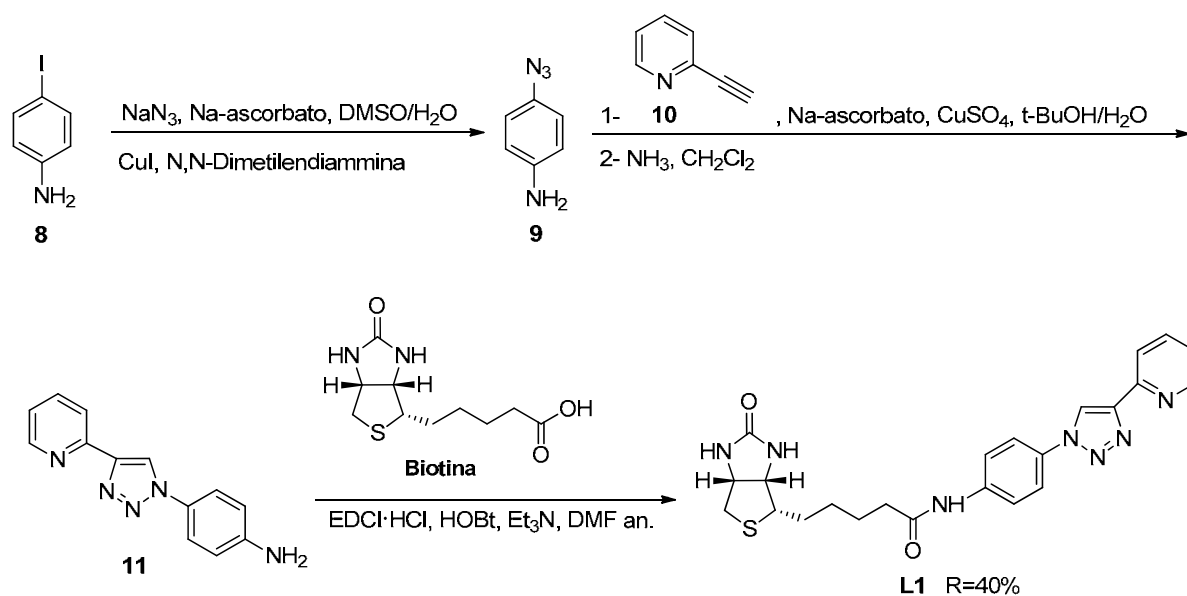


Figura 9: Schema di sintesi del legante **L1**.

La prima reazione eseguita è stata la sintesi del 4-azidoanilina **9** partendo dalla 4-iodoanilina **8** che, attraverso reazione tipo Ullmann, ha portato alla formazione dell'aryl azide intermedia **9** usata direttamente per lo stadio di sintesi successivo. (Figura 10)

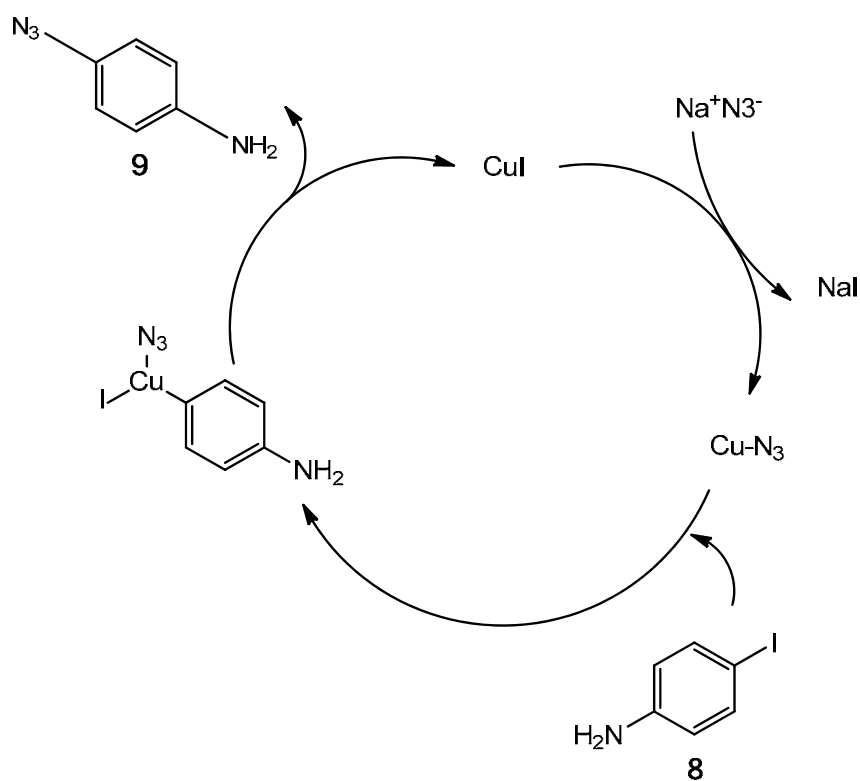


Figura 10: Reazione tipo-Ullmann.

La reazione è stata condotta in presenza di sodio azide e con sodio ascorbato come antiossidante (per mantenere il rame in forma bivalente).

Tale reazione procede attraverso un ciclo catalitico: il catalizzatore a base di Cu(I) si lega al gruppo azidico e avviene quindi un'addizione ossidativa di CuN_3 sull'aril ioduro. Il passaggio successivo è l'eliminazione riduttiva dell'aril azide con ripristino del catalizzatore CuI pronto per un nuovo ciclo.

Il secondo passaggio coinvolge una reazione di tipo "click". Le reazioni "click" permettono di ottenere prodotti complessi in modo semplice e diretto, si avvalgono dell'utilizzo di reagenti facili da reperire e inerti nei confronti dell'ossigeno e dell'acqua. Le sintesi solitamente sono relativamente veloci e permettono di ottenere buone rese di reazione.

La reazione eseguita dal nostro gruppo di ricerca, nello specifico, è una ciclo addizione azide-alchino catalizzata da Cu(I).

Il Na-ascorbato agisce da riducente permettendo così alla reazione Cu(I)-catalizzata di avvenire, nel contempo non interferisce con l'ambiente circostante.

Il complesso meccanismo di tipo "click" può essere spiegato mediante lo schema riportato in Figura 11.

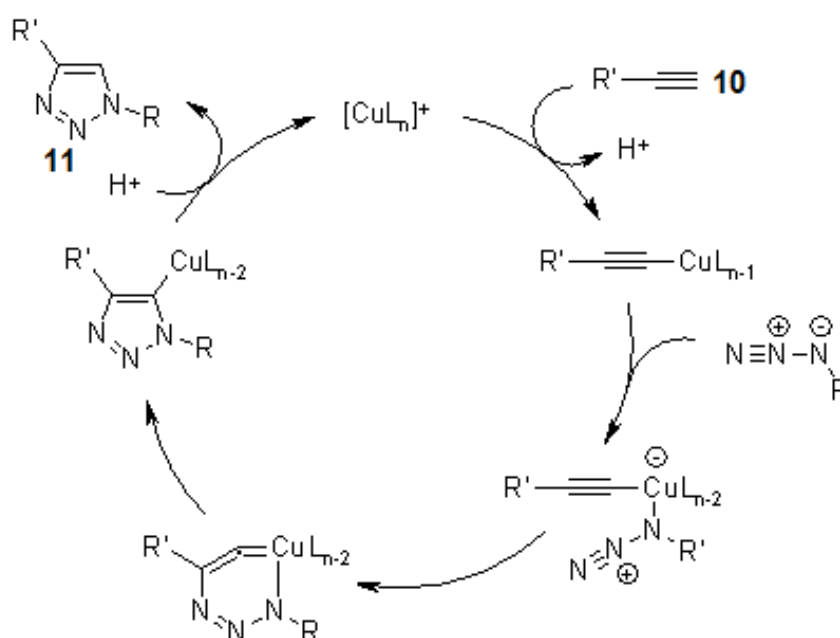


Figura 11: Meccanismo della cicloadizione azide-alchino catalizzata da Cu(I).

In primo luogo CuSO_4 , precedentemente ridotto a Cu(I) ad opera del Na ascorbato. Si coordina all'alchino mediante un legame π . L'idrogeno terminale, essendo il più acido, viene perso e si forma un intermedio Cu-acetiluro.

Successivamente l'azide sposta un legante L e si forma un complesso rame-azide-acetiluro. A questo punto avviene la ciclizzazione ad opera di un carbonio del triplo legame che effettua un attacco su un atomo di azoto causando la formazione di un metallociclo. Seguono un riarrangiamento poi una protonazione con la quale il prodotto finale viene dissociato e si riforma il complesso catalizzatore iniziale.¹⁶

Una volta ottenuto il legante 4-(4-fenil-1H-1,2,3-triazolo-1)anilina **11** è necessario effettuare un coupling tra la biotina e il gruppo amminico del composto **11** per ottenere la formazione del legame ammidico: la reazione effettuata si avvale dell'utilizzo della carbodiimide EDCI-HCl e dell'idrossibenzotriazolo HOBt. Il ruolo della carbodiimide, nello specifico, è quello di legarsi al gruppo carbossilico della biotina per formare un intermedio con un gruppo uscente migliore di quello del reagente iniziale.

Mediante l'analisi dello spettro $^1\text{H NMR}$ è stato possibile affermare che il prodotto si è formato poiché compaiono i segnali tipici della biotina, cioè quello attribuibile ai due gruppi $-\text{NH}$ a 4.08 ppm e quello attribuibile ai due $-\text{CH}$ a 6.75, insieme ai picchi del piridinotriazolo. Inoltre non è presente il protone del gruppo carbossilico poiché è stato sostituito da un'ammide.

3.1.2 Sintesi del legante L2

Il precursore dei leganti **L2** e **L4**, il 2-(1-(4-bromofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina **13**, è stato sintetizzato a partire dall'1-azide-4-bromobenzene **12** tramite una reazione di tipo "click". Il brumuro **13** che si ottiene si presenta come un solido cristallino di colore bianco.

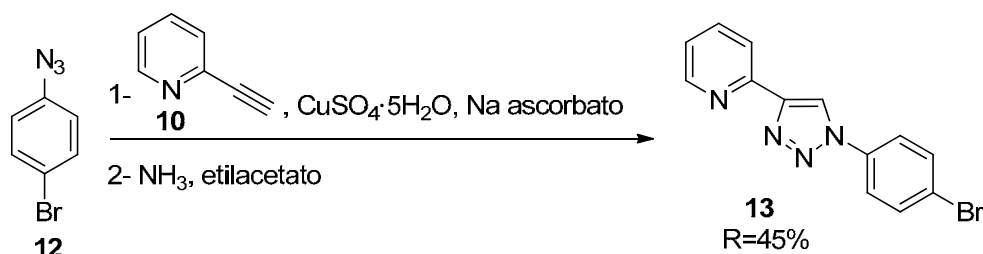


Figura 12: Cicloaddizione azide-alchino catalizzata da Cu(I) .

Per ottenere il legante **L2**, i passaggi successivi prevedono la reazione tra il bromuro **13** e l'acido boronico disostituito **14**, disponibile in commercio, al fine di ottenere l'ammina **15**. l'ultimo passaggio prevede la reazione tra quest'ultima e la biotina per ottenere l'ammide **L2**.

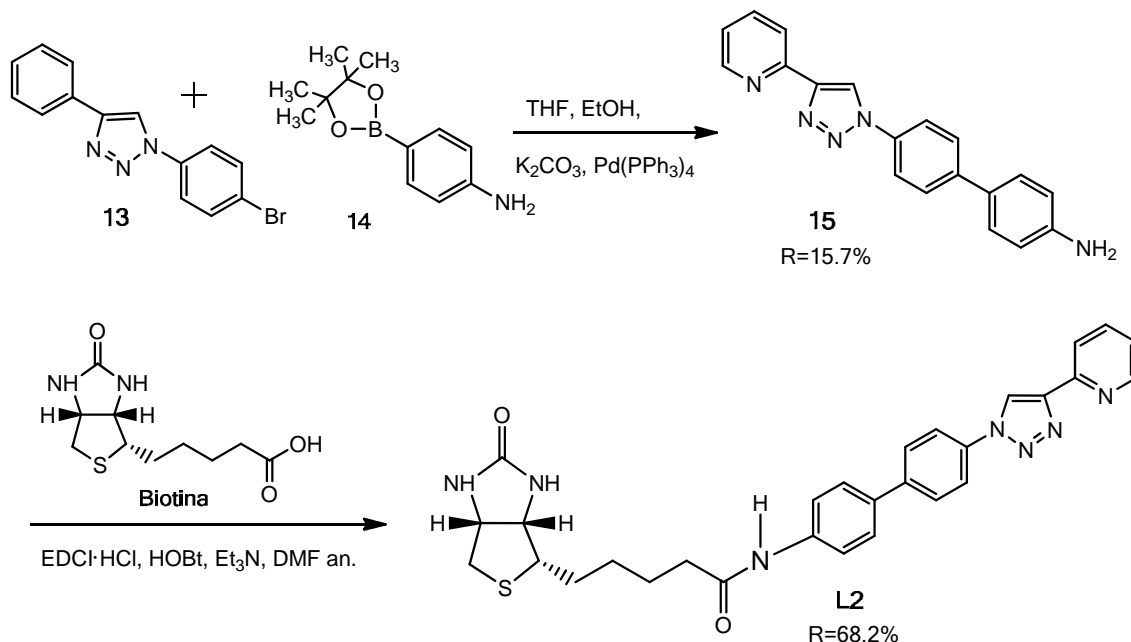


Figura 13: Sintesi del legante **L2** da 2-(1-(4-bromofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) piridina **13**.

Il primo passaggio della sintesi è una reazione di Suzuki tra la 2-(1-(4-bromofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina **13** e l'estere pinacolico dell'acido 4-amminofenilboronico **14** utilizzando palladio tetrakis(trifenilfosfina) ($\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$) come catalizzatore e carbonato di potassio come base. Il meccanismo di reazione prevede l'addizione ossidativa del $\text{Pd}(0)$ alla bromo piridina **13**. Il complesso di palladio formatosi subisce quindi l'attacco dall'acido boronico e quindi l'eliminazione riduttiva che fornisce il composto **15** e il ripristino del catalizzatore pronto per un nuovo ciclo sintetico. (Figura 14)

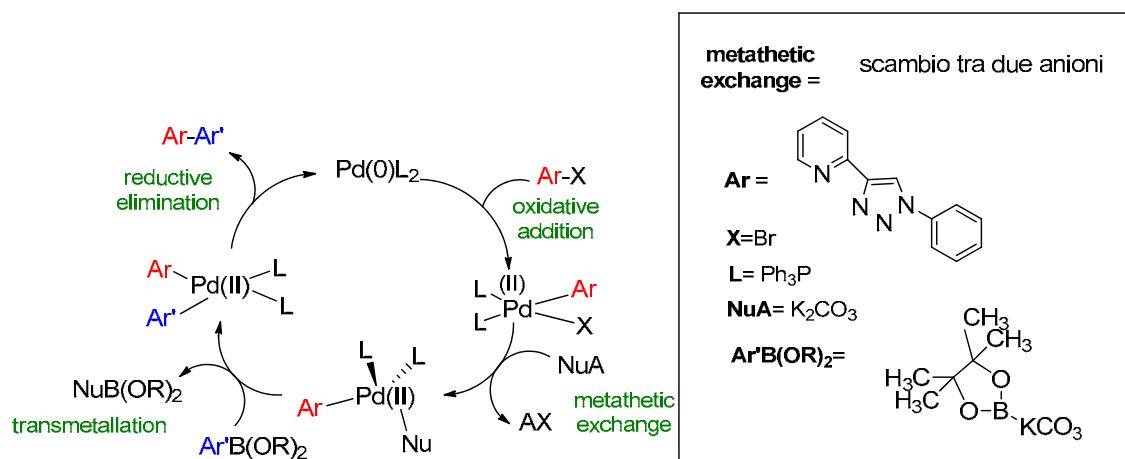


Figura 14: Coupling di Suzuki.

Per l'ultimo passaggio è stata effettuata una reazione tra il composto **15** e la biotina per la formazione dell'amide, seguendo la procedura precedentemente descritta per la sintesi di **L1**.

3.1.3 Sintesi del legante L3

Lo strategia di sintesi di **L3** è analoga a quella utilizzata precedentemente per la sintesi di **L1**.

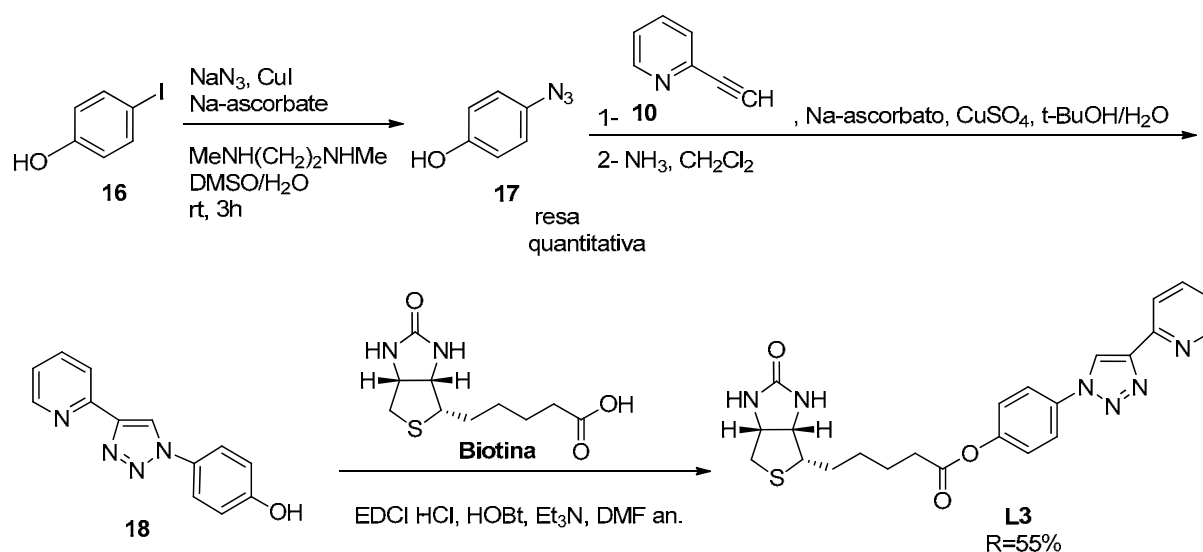


Figura 15: Schema di sintesi del legante L3.

La prima reazione eseguita è stata la sintesi dell'intermedio 4-azidofenolo **17** partendo dal 4-iodo-fenolo **16** e sodio azide, si tratta di una reazione tipo Ullmann.

Successivamente è stata eseguita una reazione di tipo “click”, tra l'azide **17** e l'etinilpiridina **10**, che ha permesso la formazione del 4-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-

triazol-1-il)fenolo **18**; infine è stato fatto reagire quest'ultimo composto con la biotina per completare la sintesi di **L3**, quest'ultimo passaggio avviene secondo un meccanismo di reazione simile a quello descritto per la formazione dei leganti amidici **L1** e **L2**.

Prima di giungere a questo schema di sintesi definitivo, il gruppo di ricerca aveva tentato altre strategie sintetiche per far reagire la biotina con il fenolo **18**. La prima via prevedeva la clorurazione della biotina con SOCl_2 facendo reagire i due composti in atmosfera inerte per due ore, ed eliminando il tionil cloruro in eccesso mediante distillazione sotto vuoto, e la successiva reazione con l'alcol **18**. Il presunto prodotto veniva poi isolato spegnendo la reazione con acqua ed estraendo con etilacetato. La successiva analisi ^1H NMR però non mostrava nessun segnale relativo al prodotto, comparivano soltanto picchi attribuibili ai reagenti per cui si è provveduto a recuperarli. La seconda via intrapresa, invece, prevedeva la reazione tra biotina e fenolo **18** in presenza di DCC (Dicloroesil carbodiimide) e DMAP (4-dimetilamminopiridina) utilizzando DMF anidra come solvente. Dopo aver constatato mediante analisi ^1H NMR che non erano presenti picchi attribuibili al prodotto desiderato, si è deciso di sostituire la DCC con un'altra carbodiimide (EDCI·HCl).¹⁷

3.1.4 Sintesi del legante L4

La sintesi del legante **L4** inizia con la preparazione del bromuro **13**, precedentemente descritta durante la sintesi di **L2**. Successivamente questo composto viene fatto reagire con l'acido 4-idrossifenilboronico **19** mediante un "coupling" di Suzuki (Figura 14) ed infine viene condotta la reazione con la biotina con il procedimento attuato per la sintesi del legante **L1**.

Lo spettro ^1H NMR del composto **L4** permette di verificare che la reazione è avvenuta con successo.

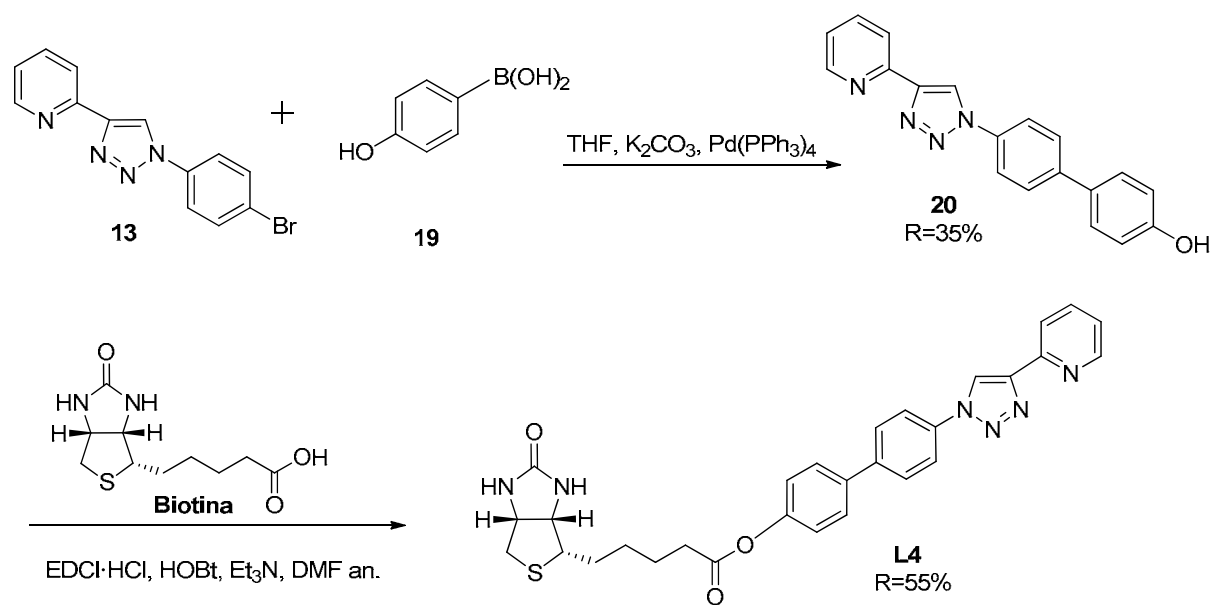


Figura 16: Sintesi del legante L4.

3.2 PREPARAZIONE DEI COMPLESSI A, B, C, D.

La sintesi dei complessi **A**, **B**, **C**, **D** prevede la reazione tra un legante **L**₁-**L**₄ e il dimero di Iridio **7**.

Il reagente di partenza normalmente utilizzato per la sintesi di complessi di Ir(III) è IrCl₃·3H₂O, da cui si ottiene il dimero **7** attraverso una reazione di ciclometallazione^{18,19,20,21,22} con un legante C^N come la 2-fenilpiridina, come mostrato nella Figura 17.

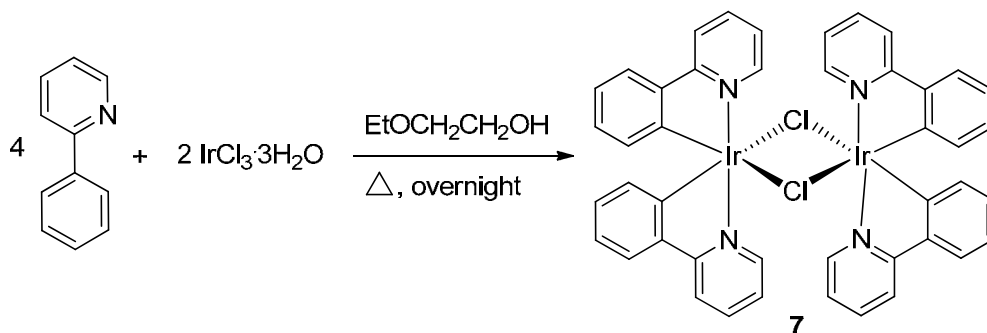


Figura 17: Reazione di sintesi del dimero Tetrakis(2-fenilpiridinato-C2,N)(μ -dicloro)di Iridio.²³

Entrambi gli atomi di iridio del dimero presentano coordinazione ottaedrica, inoltre la molecola presenta la più alta simmetria possibile, tale da rendere ogni fenilpiridina equivalente alle altre tre.

La sintesi dei complessi **A**, **B**, **C**, **D** avviene secondo il meccanismo riportato nello schema seguente.

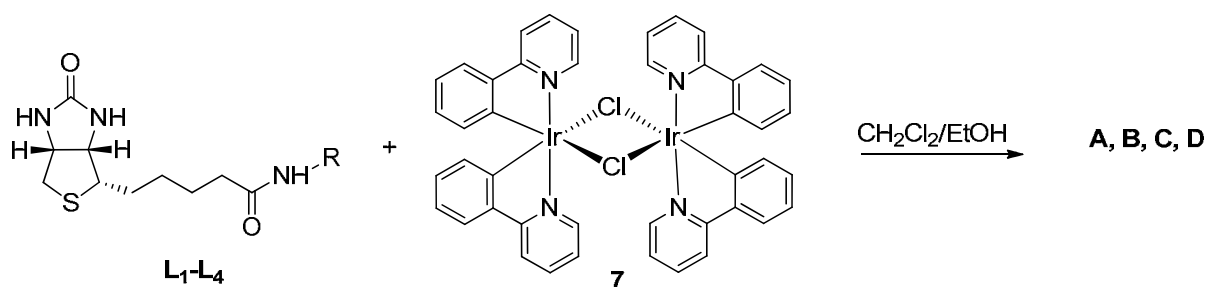


Figura 18: Sintesi dei complessi **A**, **B**, **C**, **D**.

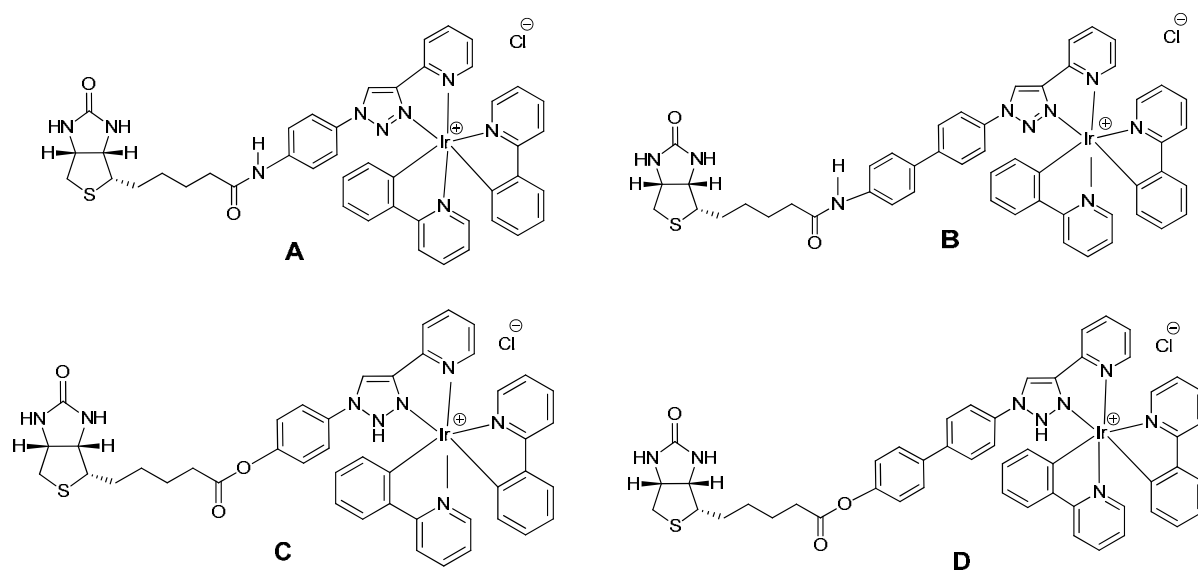


Figura 19: Complessi A, B, C, D.

Il composti che si ottengono al termine della reazione si presentano come solidi di colore giallo acceso.

Analizzando lo spettro ¹HNMR è possibile notare che i segnali della biotina non vengono alterati mentre compaiono numerosi picchi nella zona degli aromatici, si tratta dei protoni derivati dalle fenilpiridine legate all'Ir(III).

Per effettuare le analisi NMR dei complessi ammidici **A** e **B** è stato necessario utilizzare DMSO poiché risultavano essere insolubili in tutti gli altri solventi. Per i complessi **C** e **D**, cioè quelli con gruppi esterei, è stato possibile effettuare le analisi NMR in MeOH deuterato, poiché sono più solubili dei rispettivi complessi ammidici.

3.3 STUDIO DELLE PROPRIETÀ FOTOFISCHE DEI COMPLESSI

I complessi di Ir(III) oggetto di questo studio si collocano all'interno di una classe di composti estremamente importante nell'ambito degli studi dell'interazione luce-materia. In particolare, i complessi ciclotetralati di Ir(III) presentano peculiari proprietà fotoemittive, siano esse intese in termini di fotoluminescenza (PhotoLuminescence, PL) che di elettroluminescenza (ElectroLuminescence, EL), che hanno reso questi composti metallici come attori principali in studi connessi alla scienza dei materiali (dispositivi OLED per l'illuminazione a basso consumo energetico e per display flessibili o avvolgibili). Secondo un filone di ricerca ancora in via di sviluppo, alcuni recenti studi sono stati dedicati al possibile uso dei complessi di Ir(III) come probes luminescenti per molecole di interesse biologico. In quest'ultimo contesto, l'interazione tra i complessi di Ir(III) ed il target biologico viene tradizionalmente seguita osservando i cambiamenti di intensità o di energia dello spettro di emissione del composto metallico in seguito alla presenza della biomolecola stessa. Nell'ottica della proposizione di nuovi probes luminescenti a base di complessi di Ir(III), appare quindi evidente l'importanza che riveste lo studio delle proprietà fotofisiche, ossia di assorbimento e di emissione, dei nuovi complessi preparati, con particolare attenzione dedicata alla valutazione delle proprietà fotoemittive sia in solvente organico che in soluzione acquosa tamponata a pH pari a 7.4. Tale approccio è propedeutico allo studio dell'interazione eventuale tra i complessi biotinilati di Ir(III) ed il corrispettivo target proteico quale l'avidina.

3.3.1 Spettri di assorbimento ed emissione

I dati salienti relativi allo studio delle proprietà fotofisiche dei nuovi complessi cationici di Ir(III) sono riportati nelle tabelle 1-3.

In particolare, relativamente a soluzioni diluite di diclorometano ($[Ir] \text{ ca. } 10^{-4} \text{ M}$), i complessi di Ir(III) presentano profili di assorbimento simili tra loro e l'andamento registrato è caratteristico di complessi metallici con geometria ottaedrica. Ogni spettro, infatti, presenta transizioni legando centrate (LC) nella zona UV ($\lambda < 300 \text{ nm}$), mentre a valori di energia minore ($\lambda > 300 \text{ nm}$) si ritrovano le transizioni a trasferimento di carica (CT) che, nel caso di una configurazione d^6 dello ione metallico, vengono unicamente attribuite a processi del tipo MLCT (Metal-to Ligand Charge Transfer). Queste ultime transizioni sono generalmente di natura spin permessa ($^1\text{MLCT}$); va comunque precisato che il probabile contributo derivante da transizioni spin proibite ($^3\text{MLCT}$)

viene reso non trascurabile a causa della presenza di uno ione metallico della terza serie di transizione nella struttura della molecola.

Come è possibile osservare in Figura 20, gli spettri di assorbimento registrati in soluzione acquosa tamponata a pH pari a 7.4 presentano profili di assorbimento di forma simile a quella dei corrispettivi spettri ottenuti in fase organica. I complessi non risentono particolarmente della variazione della polarità del solvente, si può solo osservare un leggero spostamento delle bande a trasferimento di carica verso energie maggiori con l'unica eccezione del complesso **B** in cui tali bande si spostano verso energie minori.

complesso	λ_{ABS} (nm) in diclorometano	λ_{ABS} (nm) in soluzione tampone
A	270	270
	285 sh	285
	386	385
B	257	268
	273	305
	305 sh	413
	387	
C	269	252
	383	268
		377
D	272	271
	290 sh	288
	385	383

***Tabella 1:** Lunghezze d'onda relative all'assorbimento massimo registrato in diclorometano e in soluzione tampone.*

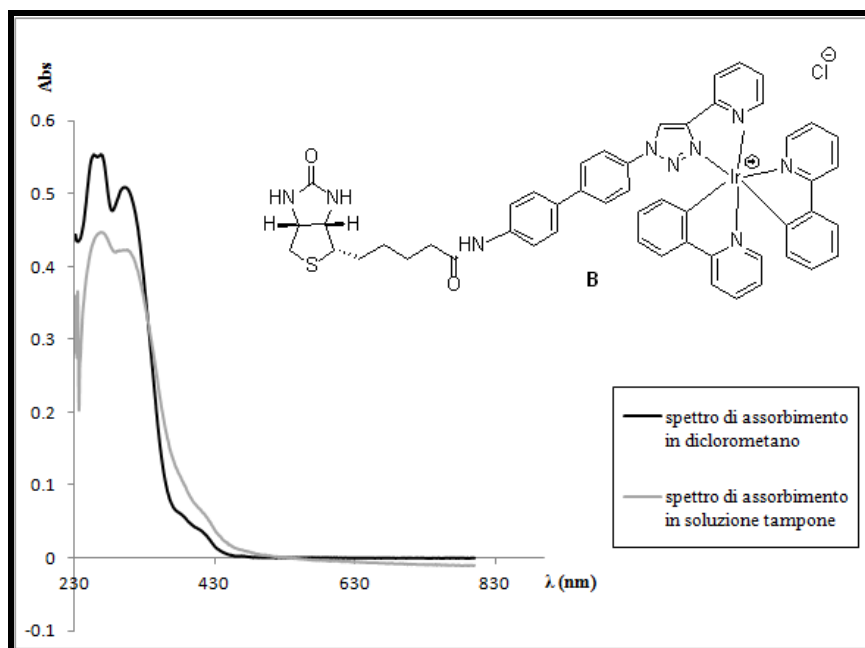


Fig 20: Spettri relativi all'assorbimento del complesso **B** in diclorometano e in soluzione acquosa tamponata a pH pari a 7.4.

In soluzioni diluite ($[\text{Ir}] < 10^{-5}$ M) di diclorometano, tutti i complessi cationici di Ir(III) riportati in questo lavoro sono fortemente luminescenti. In seguito all'eccitazione dei campioni in corrispondenza del massimo di assorbimento della transizione MLCT (λ ca. 380 nm), si è osservato, in ogni caso, un intenso processo fotoemittivo tipicamente centrato a ca. 475 nm. In ogni caso, lo spettro di emissione è strutturato, ossia risulta costituito da un massimo "principale" e da uno di intensità leggermente inferiore. Un profilo di emissione di questo tipo è assai comune per i complessi cicloometallati di Ir(III) e deriva dalla presenza di due stati eccitati emissivi di natura differente (LC e MLCT) ma con energia molto simile. Questa attribuzione è stata suffragata dall'analisi degli spettri registrati sugli stessi campioni posti in matrice congelata a 77 K. Infatti, nel passaggio dalla soluzione mantenuta a r.t. a quella congelata, si osserva come il contributo allo spettro di emissione derivante da uno stato di tipo MLCT subisca uno spostamento verso il blu, mentre il contributo LC rimane invariato in termini di energia. (Tabella 2)

complesso	λ_{EM} (nm)	τ (ns) air	τ (ns) deair	Φ Air	Φ Deair	λ_{EM} (nm) 77 °K	τ (ns) 77 °K
A	542 474 504	134.03	508	0.1265	0.6261	470 502	4527
B	476 508	227	1115	0.077	0.340	470 504 532	4505
C	476 508	134	506.65	0.099	0.249	468 502 530	3910
D	474 504	131	816	0.122	0.446	468 502 528	4165

Tabella 2: Dati ottenuti registrando gli spettri in diclorometano.

Come anticipato, in soluzione organica i complessi sono intensamente emissivi. Infatti, le rese quantiche di emissione (Φ_{em}) variano in un intervallo posto tra 8 e 13% circa. Una prima prova del carattere fosforescente dell'emissione è fornito dall'incremento dell'intensità di emissione che si osserva passando da soluzione in equilibrio con l'aria a soluzioni deossigenate. In quest'ultimo caso, le rese quantiche di emissione aumentano sensibilmente fino ad attestarsi tra il 25 ed il 65%. La natura fosforescente delle emissioni viene infine comprovata dall'analisi risolta nel tempo, ossia dalla determinazione dei tempi di vita delle emissioni stesse. Si è potuto osservare come tali decadimenti convergano verso tempistiche dell'ordine del centinaio di nanosecondi e che i vari intervalli temporali si prolungano considerevolmente passando a soluzioni degasate e a campioni congelati.

In prima analisi, i nuovi complessi di Ir(III) mostrano caratteristiche idonee alla loro proposizione come probes luminescenti. Sono infatti fortemente emissivi e l'emissione fosforescente, che è centrata nella zona più energetica dello spettro del visibile, è caratterizzata da un pronunciato *Stokes shift*. A questo punto è però necessario verificare

se tali peculiarità vengono mantenute in un ambiente acquoso come quello utilizzato per lo studio della interazione dei complessi biotinilati di Ir(III) con una proteina idrosolubile quale l'avidina.

In ambiente acquoso, eccitando i campioni a una lunghezza d'onda di 375 nm *ca*, si è osservato che il profilo di emissione rimane sostanzialmente invariato rispetto a quello registrato nello spettro del campione in ambiente organico. Si può osservare ciò nelle Figura 21 dove è stato riportato sia lo spettro registrato in diclorometano che quello in ambiente acquoso.

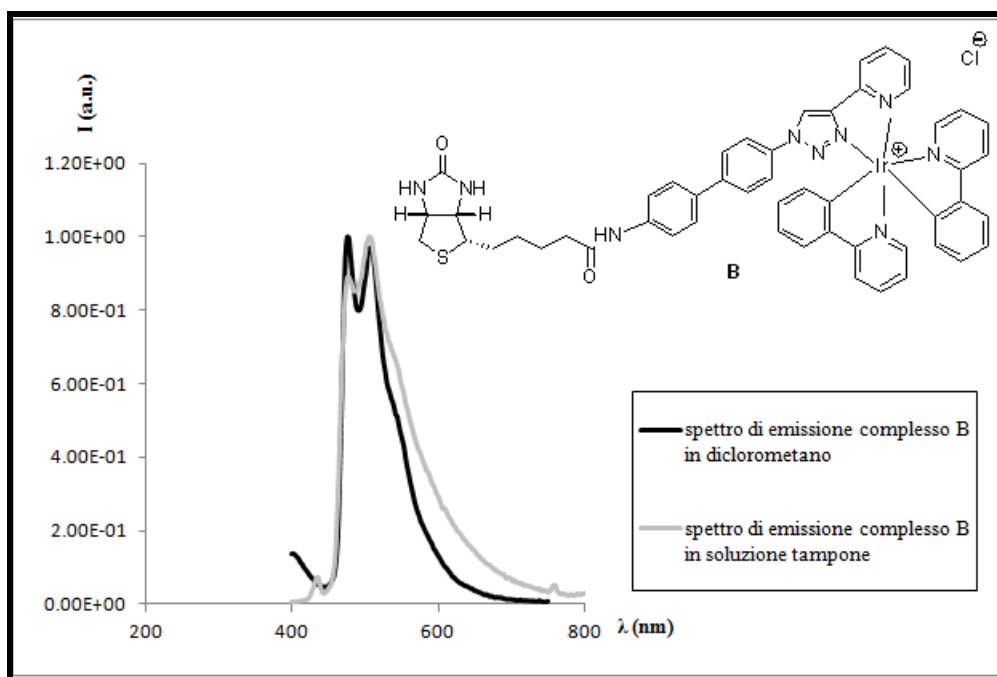


Figura 21: Spettri di emissione del complesso B registrato in diclorometano e in soluzione acquosa tamponata a pH pari a 7.4.

I tempi di vita e le rese misurate in ambiente acquoso sono riportate nella tabella 3. E' possibile notare che i tempi hanno valori più elevati rispetto a quelli registrati in ambiente organico mentre le rese sono leggermente inferiori.

complesso	λ_{EM} (nm)	τ (ns) air	Φ Air
A	478	41.202 (30.72%)	0.0984
	506	304.712 (69.28%)	
B	476	458	0.0163
	502		
C	478	417.6	0.059
	506		
D	480	393	0.0565
	504		

Tabella 3: Dati ottenuti registrando gli spettri nella soluzione tampone.

3.3.2 Interazione avidina-complessi A, B, C, D

Una volta caratterizzate compiutamente le proprietà di assorbimento e di emissione dei complessi biotinilati di Ir(III), si è passati alla verifica della loro interazione con avidina. A tale scopo, sono stati monitorate le variazioni nello spettro di emissione di ciascun complesso come conseguenza della presenza dell'avidina stessa. Sono state effettuate delle vere e proprie titolazioni di campioni contenenti avidina disciolta in tampone fosfato a pH 7.4, utilizzando come titolante il complesso biotinilato di Ir(III). La concentrazione dell'analita (avidina) è 3.8 μ M e le titolazioni sono state condotte aggiungendo aliquote (5 μ L) della soluzione di complesso in concentrazione nota.

Gli esperimenti sono stati razionalizzati mettendo in grafico l'aumento di intensità di emissione del complesso misurata a 480 nm (asse y) in rapporto alle aggiunte del complesso stesso alla soluzione 3.8 μ M di avidina (asse x). Come si osserva in Figura 22, l'incremento dell'intensità di emissione è lineare per un certo numero di aggiunte. Quindi si riscontra un punto di flesso dopo il quale si registra la variazione del coefficiente angolare. Un comportamento di questo tipo può essere interpretato come la progressiva saturazione dei siti dell'avidina da parte del complesso biotinilato. Al punto di flesso, presumibilmente, l'avidina è stata saturata e l'andamento dell'intensità di emissione dopo il punto di flesso è da attribuirsi all'aumento di concentrazione del complesso biotinilato "libero".

Per accertarsi che la variazione di intensità di emissione della soluzione fosse realmente legata all'interazione complesso biotinilato di Ir(III)-avidina, è stato necessario eseguire anche due titolazioni di controllo. La prima consiste in una titolazione in assenza di avidina durante la quale vengono aggiunte aliquote di complesso biotinilato a una soluzione di potassio solfato tamponata a pH 7.4. La seconda, invece, consiste in una titolazione in cui successive aliquote del complesso biotinilato vengono aggiunte a una soluzione di avidina precedentemente saturata con un eccesso di biotina pura. Anche in questi due casi è stato messo in grafico l'aumento di intensità di emissione del complesso misurato a 480 nm (asse y) in rapporto alle aggiunte del complesso stesso alla soluzione (asse x), nel primo caso di semplice tampone mentre nel secondo di avidina saturata. Nelle Figure 22-24 è possibile notare che i grafici degli esperimenti di controllo dei complessi **A**, **B**, **D** seguono un andamento totalmente differente da quello della titolazione principale. L'unica similitudine riscontrata è stata quella tra l'andamento dei dati del secondo esperimento di controllo con l'andamento dei dati della titolazione principale dopo il punto di flesso.

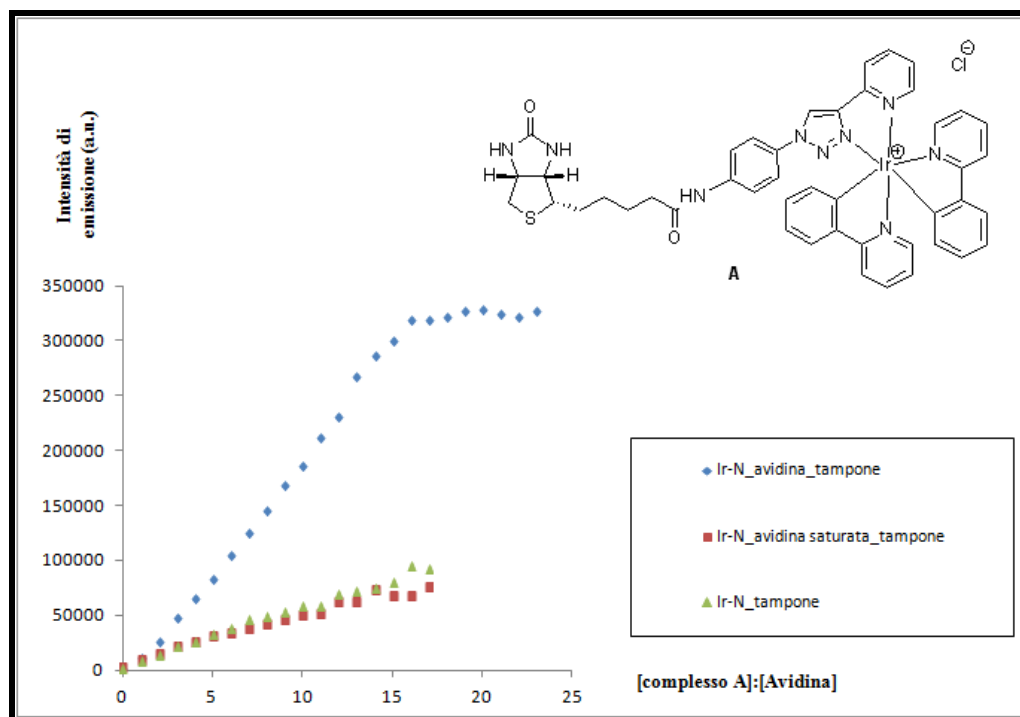


Figura 22: Curve di titolazione di emissione di una soluzione di avidina $3.8 \mu\text{M}$ (blu), una soluzione di avidina $3.8 \mu\text{M}$ saturata con biotina (rossa), e una soluzione di tampone fosfato 50mM (verde) con una soluzione di complesso **A** 0.308 mM .

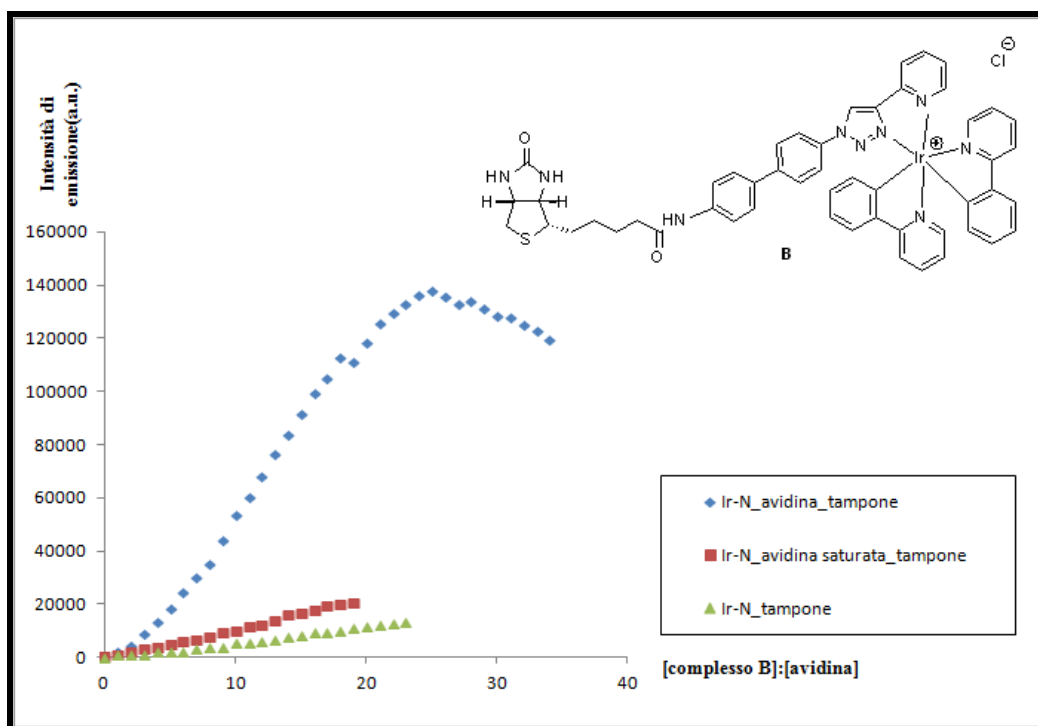


Figura 23: Curve di titolazione di emissione di una soluzione di avidina $3.8 \mu\text{M}$ (blu), una soluzione di avidina $3.8 \mu\text{M}$ e biotina (rossa), e una soluzione di tampone fosfato 50mM (verde) con una soluzione di complesso **B** 0.338 mM .

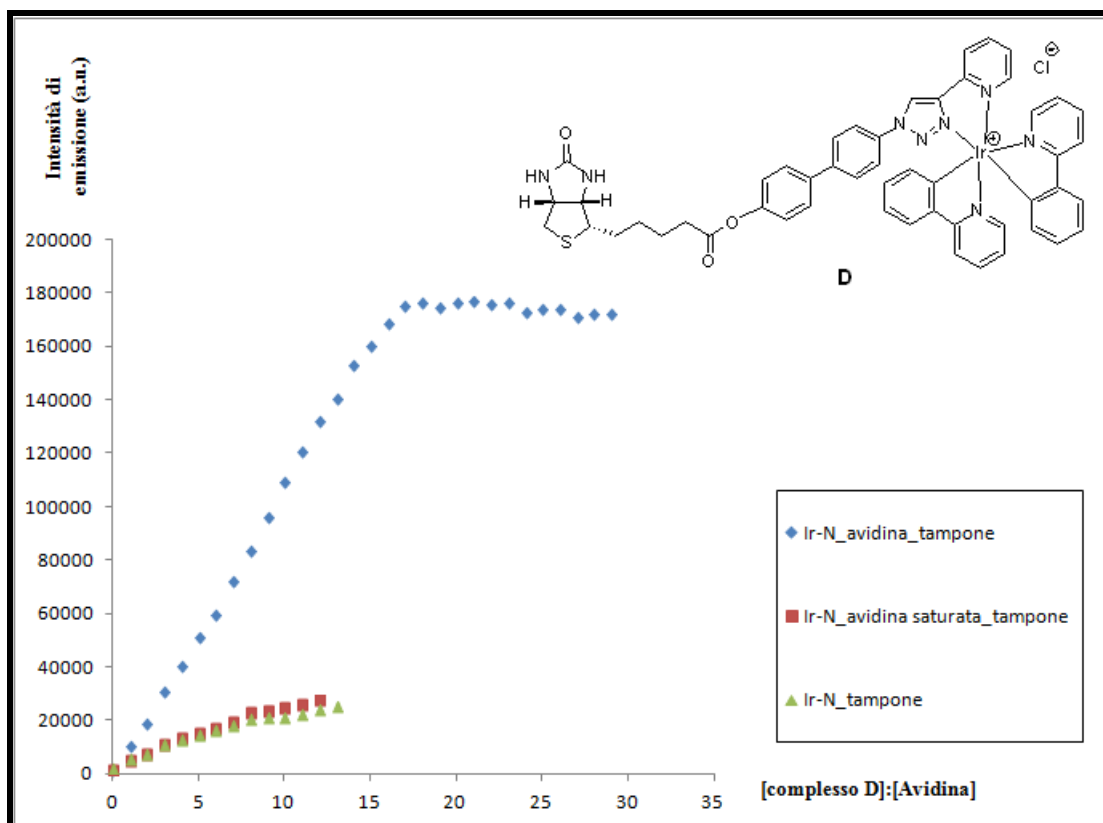


Figura 24: Curve di titolazione di emissione di una soluzione di avidina 3.8 μM (blu), una soluzione di avidina 3.8 μM e biotina (rossa), e una soluzione di tampone fosfato 50mM (verde) con una soluzione di complesso **D** 0.35 mM.

Dal confronto dei vari esperimenti, è possibile notare come il complesso **C** mostra un comportamento diverso da quello precedentemente descritto relativo agli altri composti. Come si può notare dalla Figura 25, contrariamente a quanto si verifica nel caso degli altri complessi, l'interazione con l'avidina si traduce in una diminuzione dell'intensità di emissione del complesso. In questo grafico la retta mostra un coefficiente angolare tale per cui risulta difficile cogliere nettamente il punto di flesso.

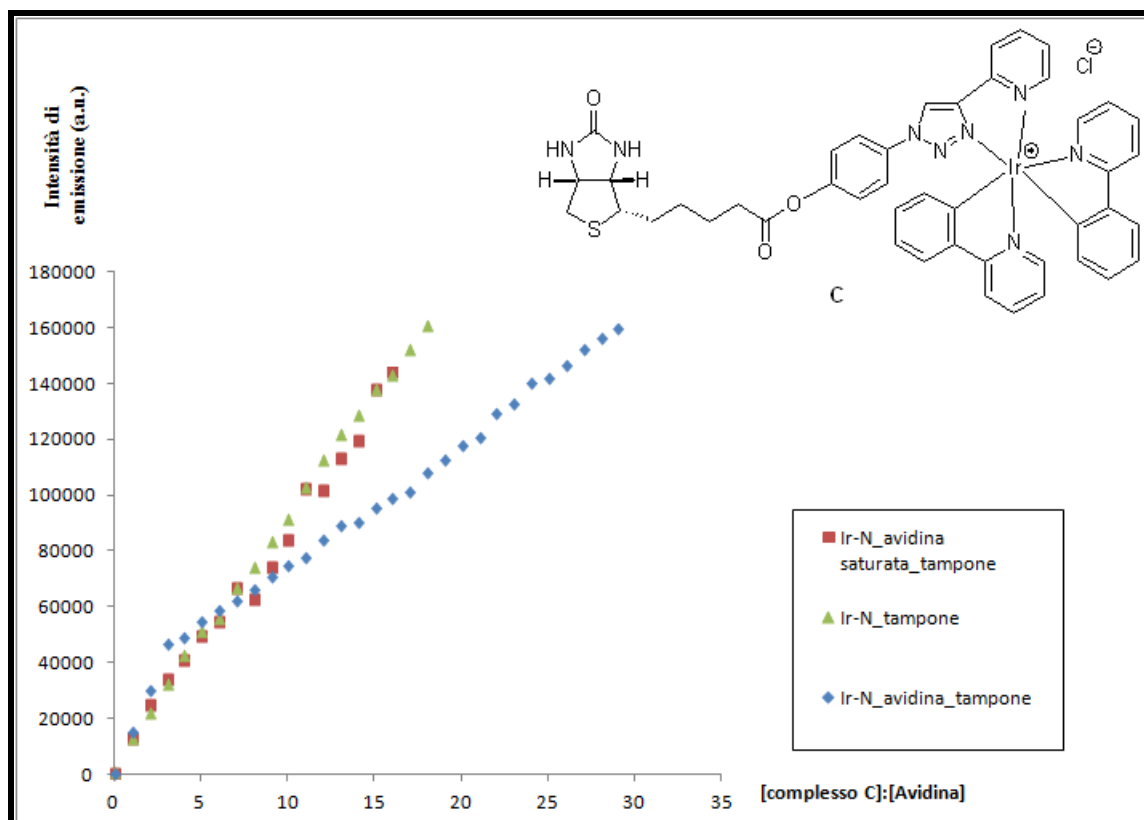


Figura 25: Curve di titolazione di emissione di una soluzione di avidina $3.8 \mu\text{M}$ (blu), una soluzione di avidina $3.8 \mu\text{M}$ e biotina (rossa), e una soluzione di tampone fosfato 50mM (verde) con una soluzione di complesso **C** 0.338 mM .

Dal momento che l'andamento della titolazione dell'avidina pura con il complesso biotinilato presenta un andamento diverso dai due esperimenti di controllo è possibile dedurre che la proteina influisce sulle proprietà emissive del complesso biotinilato e che stabilisce con esso un'interazione.

Al punto di flesso, presumibilmente, l'avidina è stata saturata per cui si dovrebbe avere un rapporto $[\text{complesso}]:[\text{avidina}]=4:1$. Se i complessi biotinilati non sono completamente solubili in soluzione acquosa è possibile che tale rapporto non venga rispettato.

3.3.3 Saggi con il colorante HABA

Le stechiometria dell'interazione dell'avidina con i complessi biotinilati di Ir (III) è stata studiata tramite saggi con il colorante HABA (4'-idrossiazobenzene-2-acido carbossilico) che si basano sulla competizione tra la biotina e l'HABA nel legarsi ai quattro siti della proteina. In particolare, l'affinità dell'HABA per l'avidina ($K_D = 6 \cdot 10^{-6}$

$6M$ ca) è minore rispetto a quella per la biotina ($K_D = 10^{-15}M$ ca). Quindi, la biotina è in grado di scalzare l'HABA dall'addotto HABA-avidina. Tale evento viene evidenziato dalla diminuzione dell'assorbanza a 500 nm, lunghezza d'onda in cui si trova il massimo di assorbimento caratteristico dell'HABA legato all'avidina.

Tali saggi consistono nella titolazione di una soluzione acquosa contenente il complesso HABA-avidina con la biotina in cui si va a registrare il calo dell'assorbanza della soluzione a 500nm dopo ogni aggiunta.

L'esperimento è stato razionalizzato ponendo in grafico il valore $-\Delta Abs_{500nm}$ (asse y) in rapporto alle aggiunte di biotina alla soluzione contenente il complesso HABA-avidina (asse x). Dalla Figura 26 si può notare come i valori di $-\Delta Abs_{500nm}$ seguano un andamento lineare fino a un punto di equivalenza dopo il quale la pendenza diminuisce. Si presuppone che in corrispondenza di tale punto la biotina abbia saturato l'avidina. Dal momento che questa proteina possiede quattro siti di legame, il punto di equivalenza dovrebbe trovarsi in corrispondenza di un rapporto di concentrazioni pari a $[biotina]:[avidina]=4:1$.

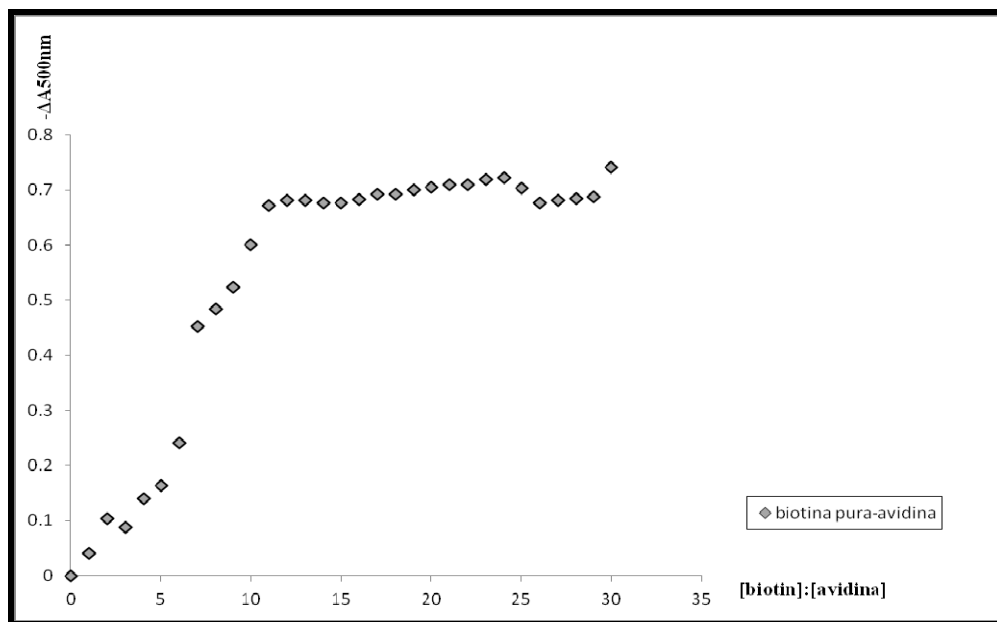


Figura 26: Curva relativa alla titolazione della soluzione di HABA-avidina con biotina non modificata.

Lo stesso esperimento è stato effettuato sostituendo la biotina “libera” con un complesso biotinilato (Figura 27) per verificare se si sarebbe comporto in modo analogo alla biotina.

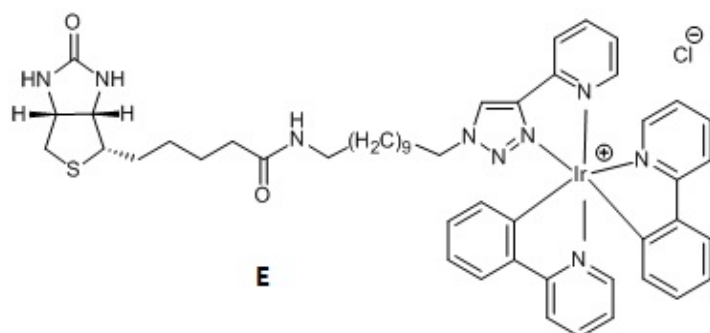


Figura 27: Complesso *E* Ir(III)-biotina.

Razionalizzando l’esperimento come il precedente è stato ottenuto il grafico riportato di seguito.

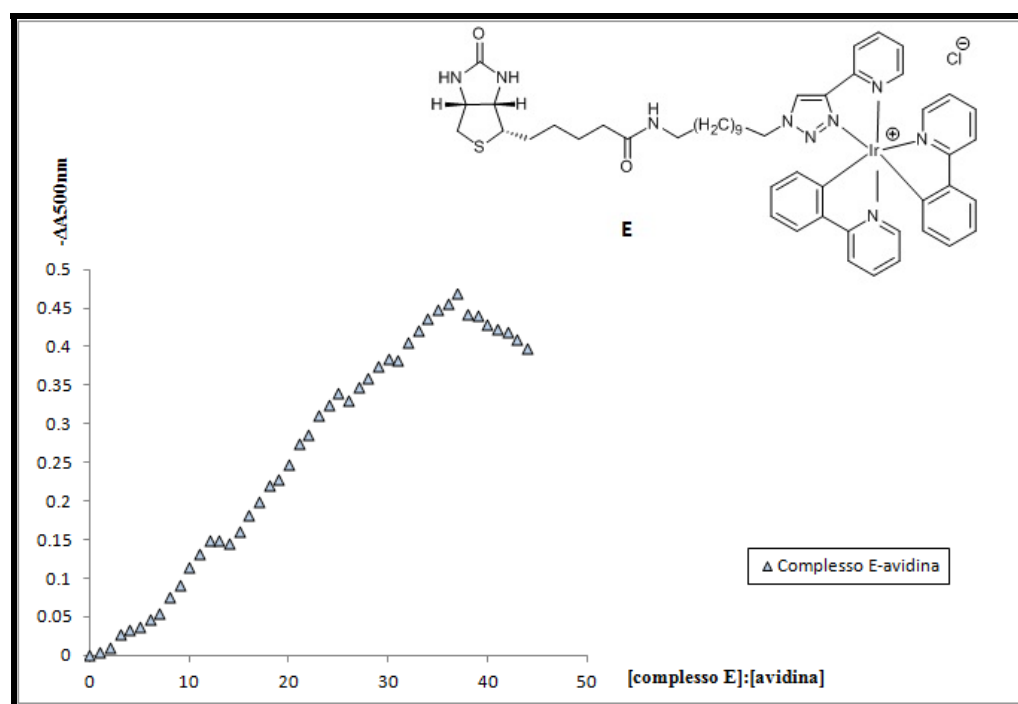


Figura 27: Curva relativa alla titolazione della soluzione di HABA-avidina con il complesso biotinilato *E*.

Visto che anche in questo caso si osserva un andamento lineare per i valori di $-\Delta\text{Abs}_{500\text{nm}}$ fino a un punto di equivalenza dopo il quale la pendenza diminuisce, si può affermare che il complesso **E** interagisce con l’avidina andando ad occupare i suoi siti scalzando il colorante.

4. CONCLUSIONI

Durante il periodo di tesi è stato messo a punto un metodo di sintesi dei leganti piridin triazolici **L₁-L₄** (Figura 7) che poi sono stati fatti reagire con il dimero di Iridio **7** al fine di formare i nuovi complessi esacoordinati **A, B, C, D** riportati in Figura 19. Tutte le reazioni sono state seguite attraverso spettroscopia NMR e i complessi ottenuti sono stati caratterizzati tramite metodi spettroscopici (NMR e MASSA).

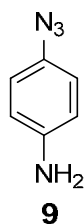
I complessi di iridio preparati possono trovare impiego come sonde luminescenti grazie alla presenza di un'unità biotinica sul legante capace di coniugare l'avidina, una proteina caratteristica dell'albume d'uovo. Di conseguenza è stato necessario studiarne le proprietà fotofisiche, ossia di assorbimento e di emissione, sia in solvente organico che in soluzione acquosa tampone a pH pari a 7.4. Successivamente sono state studiate le interazioni complesso biotinilato-target biologico, avidina nel nostro caso, effettuando delle titolazioni di campioni contenenti avidina disciolta in tampone fosfato a pH 7.4, utilizzando come titolante il complesso biotinilato di Ir(III). Infine è stata studiata la stechiometria dell'interazione dell'avidina con i complessi biotinilati tramite saggi con il colorante HABA (4'-idrossiazobenzene-2-acido carbossilico).

Sulla base dei risultati ottenuti si può concludere che i complessi ottenuti possiedono buone proprietà fotoemittive e che esse variano in presenza di una molecola biologica, la proteina avidina, perché si stabilisce una forte interazione tra essa e tra l'estremità biotinica dei complessi di Ir(III).

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 Preparazione del complesso A

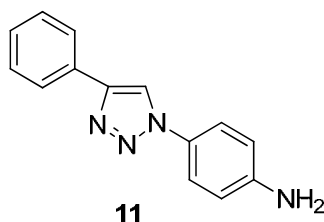
5.1.1 Sintesi della 4-azidoanilina



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura²⁴ In un pallone a due colli si sciolgono la 4-iodoanilina (3.51 g, 15.00 mmol), NaN₃ (1.95 g, 30.00 mmol, 2 eq) e Na ascorbato (0.16 g, 0.75 mmol, 0.05 eq) in una miscela DMSO/H₂O in rapporto 5:1. La miscela viene degasata con una corrente di azoto per 10 minuti. Al termine di questo periodo si aggiungono CuI (0.29 g, 1.50 mmol, 0.1 eq) e N,N-Dimetilendiammina (0.25 ml, 0.15 eq).

La reazione viene condotta sotto atmosfera inerte di azoto per una notte. Al termine all'analisi TLC si nota come tutto il prodotto di partenza sia stato convertito nel prodotto voluto, quindi si procede al work-up estraendo la miscela con etil acetato e lavando con acqua. Dopo anidificazione della fase organica, il solvente viene rimosso in vuoto e il grezzo di reazione viene direttamente utilizzato per la reazione successiva.

5.1.2 Sintesi del 4-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)anilina



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁵

In un pallone ad un collo si scioglie la 4-azidoanilina (2.01 g, 15.0 mmol) in una miscela *t*-BuOH/H₂O in rapporto 1:1 (37.50 ml). Si aggiungono l'2-etinilpiridina (1.90 g, 16.50 mmol, 1.9 eq), Na ascorbato (0.97 g, 4.50 mmol, 0.3 eq) e CuSO₄ (0.19 g, 0.75 mmol, 0.05 eq) poi si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte.

Al termine del tempo previsto si porta a secco la miscela al rotavapor. In seguito si aggiungono NH_3 (150 ml) e CH_2Cl_2 (150ml). Si lascia poi sotto agitazione per 2 giorni sempre a temperatura ambiente.

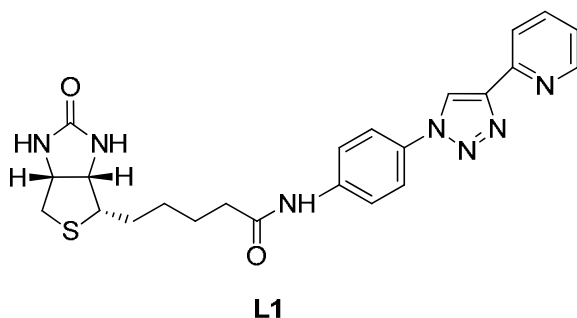
Infine si estrae per tre volte la fase acquosa con CH_2Cl_2 . Si recupera la fase organica in cui è disciolto il prodotto e lo si purifica mediante colonna cromatografica su silice con una miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=97/3$.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 45 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.60 (d, $J_{\text{HH}}=4.10$ Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.23 (d, $J_{\text{HH}}=7.95$ Hz, 1H), 7.78 (triplo doppietto, $J_{\text{HH}}=7.74$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J_{\text{HH}}=8.63$, 2H), 7.27-7.20 (m, 1H), 6.76 (d, $J_{\text{HH}}=8.73$ Hz, 2H), 4.04 (bs, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75 MHz) δ 150.22 (C), 149.47 (CH), 148.53 (C), 147.44 (C), 136.95 (CH), 128.39 (C), 122.94 (CH), 122.11 (CH), 120.34 (CH), 120.08 (CH), 115.27 (CH).

5.1.3 Sintesi del legante L1



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁶

In un pallone a due colli si pongono biotina (0.12 g, 0.50 mmol), EDCI \cdot HCl (0.12 g, 0.6 mmol), HOBt (0.08 g, 0.6 mmol) e Et_3N (0.11 ml, 1.44 mmol, 1.6 eq) poi lo si degasa con una corrente di azoto per dieci minuti. Al termine di questo periodo si aggiunge DMF anidra (6 ml) e si lascia sotto agitazione per altri 10 minuti. Infine si aggiunge il composto 4-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)anilina e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione per 3 giorni.

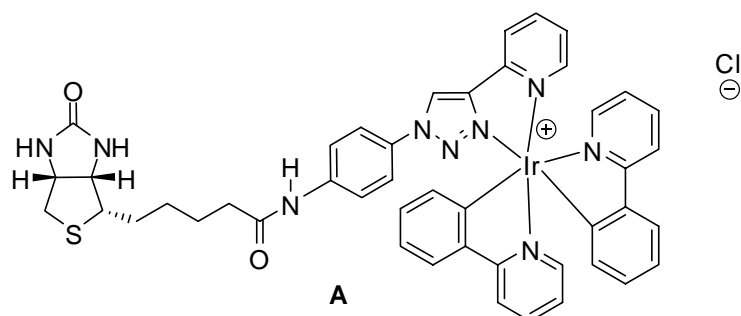
La miscela viene portata a secco in vuoto per eliminare la DMF. Il solido ottenuto viene purificato tramite cromatografia su colonna di allumina con una miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=94/4$.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 40%.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ 8.60 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=4.31$ Hz), 8.46 (s, 1H), 8.23 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=7.80$ Hz), 7.78 (t, 1H, $J_{\text{HH}}=7.80$ Hz), 7.51 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=8.77$ Hz), 7.24 (t, 1H, $J_{\text{HH}}=5.84$ Hz), 6.75 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=8.50$), 4.08 (s, 2H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz) δ 172.01 (C), 163.19 (C), 150.10 (CH), 150.03 (C), 148.51 (C), 140.24 (C), 137.76 (CH), 131.92 (C), 123.73 (CH), 121.43 (CH), 121.79 (CH), 120.21 (CH), 120.74 (CH), 61.51 (CH), 59.67 (CH), 55.84 (CH), 40.31 (CH_2), 36.70 (CH_2), 28.68 (CH_2), 28.55 (CH_2), 25.50 (CH_2).

5.1.4 Sintesi del complesso A



In un pallone ad un collo si pongono il legante **L1** (0.014 g, 0.030 mmol) e il dimero di Iridio **7** (0.015 g, 0.015 mmol, 0.5 eq) poi si aggiungono come solventi CH_2Cl_2 e EtOH in rapporto 3:1 (5 ml). La miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 giorni.

Al termine di questo periodo la miscela è stata portata a secco al rotavapor poi il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica su silice con miscela eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=90/10$.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 65.7%.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 10.40 (s, 1H), 10.01 (s, 1H), 8.46 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=7.78$ Hz), 8.28-8.20 (m, 3H), 7.96-7.86 (m, 4H), 7.86-7.80 (m, 3H), 7.72 (d, 3H, $J_{\text{HH}}=6.97$ Hz), 7.66 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=5.30$), 7.56 (t, 1H, $J_{\text{HH}}=6.33$ Hz), 6.17 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=4.33$ Hz), 7.00 (t, 1H, $J_{\text{HH}}=7.50$ Hz), 6.90 (q, 2H, $J_{\text{HH}}=7.50$ Hz), 6.79 (t, 1H, $J_{\text{HH}}=7.50$ Hz), 6.41 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.20-6.12 (m, 2H), 4.31-4.23 (m, 1H), 4.12-4.08 (m, 1H), 3.10 (m, 1H), 2.80 (dd, 1H, $J_{\text{HH}}=4.70$ Hz), 2.56 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=12.40$ Hz), δ 2.34 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=6.47$ Hz), 1.60-1.05 (m, 6H).

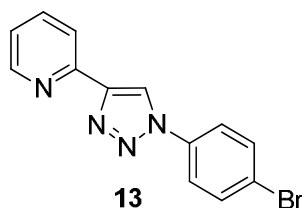
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 172.21 (C), 167.68 (C), 166.94 (C), 163.18 (C), 152.80 (C), 150.40 (CH), 150.03 (CH), 149.93 (C), 149.45 (CH), 149.38 (C), 149.14 (C), 146.81 (C), 144.49 (C), 144.52 (C), 141.37 (C), 140.62 (CH), 139.28 (CH),

139.18 (CH), 131.90 (CH), 131.28 (CH), 131.02 (CH), 130.65 (CH), 129.90 (CH), 127.59 (CH), 125.66 (CH), 125.44 (CH), 124.98 (CH), 124.43 (CH), 124.20 (CH), 123.37 (CH), 122.91 (CH₂), 122.92 (CH), 122.08 (CH), 120.32 (CH), 120.15 (CH), 61.50 (CH), 59.66 (CH), 55.81 (CH), 36.63 (CH₂), 36.33 (CH₂), 28.66 (CH₂), 28.53 (CH₂), 25.38 (CH₂).

ESI – MS: 964 (M⁺, 100)

5.2 Preparazione del complesso B

5.2.1 Sintesi del 2-(1-(4-bromofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il) piridina



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁷

In un pallone si pongono l'1-azido-4-bromobenzene precedentemente sintetizzata (0.34 g, 2.0 mmol, 1 eq), l'etnilpiridina (225 µl, 1.2 eq), Na-ascorbato (43 mg, 0.2mmol, 0.1 eq) e una soluzione acquosa 2M di CuSO₄·5H₂O (3 ml, 0.6 mmol, 0.3 eq) poi la si lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte.

Al termine del tempo previsto si porta a secco la miscela al rotavapor. In seguito si scioglie il solido ottenuto con NH₃ acquosa ed etilacetato, poi si lascia la miscela sotto agitazione a temperatura ambiente per un'altra notte.

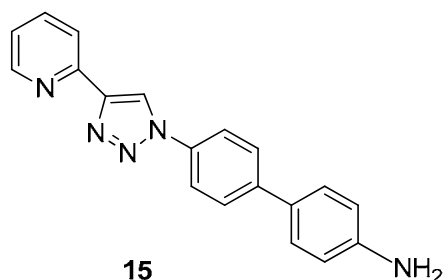
Il giorno seguente si estrae la fase acquosa con etilacetato, si anidrifca la fase organica e la si porta a secco. Il grezzo estratto è stato purificato per cromatografia su colonna di allumina (CH₂Cl₂/Etilacetato=80/20).

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 45%.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 8.62 (dq, 1H, *J*_{HH}=4.8, *J*_{HH}=1.0), δ 8.52 (bs, 1H), 8.25 (dt, 1H, *J*_{HH}=1.1, *J*_{HH}=7.9), 7.82 (td, 1H, *J*_{HH}=7.9, *J*_{HH}=1.9), 7.75-7.65 (m, 4H), 7.28 (ddd, 1H, *J*_{HH}=1.3, *J*_{HH}=4.9, *J*_{HH}=7.6).

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 149.9 (C), 149.8 (CH), 149.4 (C), 137.2 (CH), 136.1 (C), 133.2 (CH), 122.7 (C), 122.0 (CH), 120.7 (CH), 119.9 (CH).

5.2.2 Sintesi della 4'-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-[1,1'-bifenil]-4-ammina



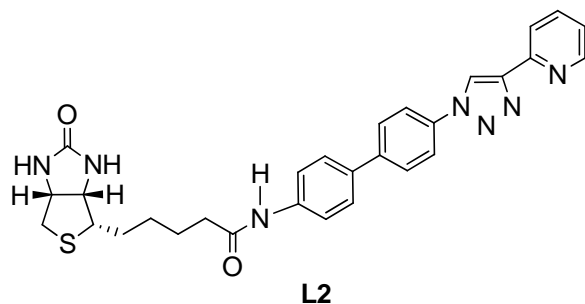
La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁸

I composti 2-(1-(4-bromofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina (0.602 g, 2.00 mmol) e il acido 4-amminofenilboronico estere pinacolico (0.55 g, 2.50 mmol) sono stati sciolti in THF (6 ml) all'interno di un pallone a due colli. In seguito sono stati aggiunti l'EtOH (0.25 ml) e una soluzione 2M di K₂CO₃ in acqua (2 ml). La miscela è stata poi degasata con una corrente di azoto per 10 minuti. Al termine di questo periodo è stato aggiunto il Pd(PPh₃)₄ (1 eq). Infine la miscela di reazione è stata posta sotto agitazione a riflusso sotto atmosfera di azoto per due giorni. Al termine del tempo previsto si estrae il prodotto con etilacetato, successivamente si anidrifica la fase organica, la si filtra ed, infine, la si porta a secco al rotavapor.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 15.7%.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ : 8.64 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 8.29 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=7.9$ Hz), 7.84 (m 3H), 7.70 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=7.5$ Hz), 7.46 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=7.5$ Hz), 7.30 (s, 1H), δ 6.80 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=7.5$ Hz).

5.2.3 Sintesi del legante L2



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁶

In un pallone a due colli si pongono biotina (0.22 g, 0.90 mmol), EDCI · HCl (0.21 g, 1.08 mmol), HOBt (0.15 g, 1.08 mmol) e Et₃N (0.2 ml, 1.44 mmol, 1.6 eq) poi lo si degasa con una corrente di azoto per dieci minuti. Al termine di questo periodo si

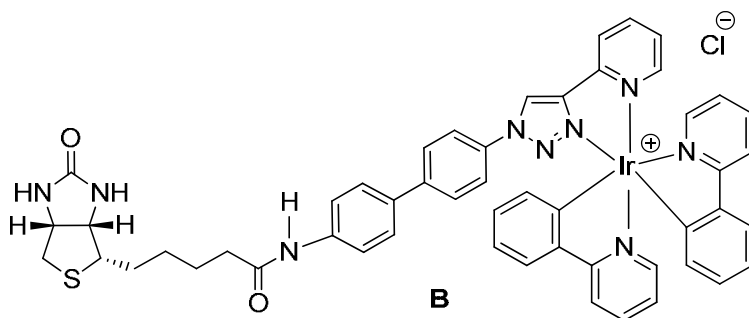
aggiunge DMF anidra (6 ml) e si lascia sotto agitazione per altri 10 minuti. Infine si aggiunge il composto **15** (0.28 g, 0.9 mmol) e si lascia la miscela di reazione sotto agitazione per 24 ore a temperatura ambiente.

Il giorno seguente si precipita il prodotto con MeOH poi lo si filtra con un filtro Büchner e lo si lascia seccare completamente.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 62.8%.

¹H NMR (DMSO, 300 MHz) δ 10.05 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.68 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=4.2$ Hz), 8.13 (m, 3H), 7.96 (td, 1H, $J_{\text{HH}}=1.8$ Hz), 7.89 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=8.8$ Hz), 7.65 (s, 4H), 7.42 (ddd, 1H, $J_{\text{HH}}=0.7$ Hz, $J_{\text{HH}}=4.9$ Hz, $J_{\text{HH}}=7.6$ Hz), 6.45 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 4.32 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 2.35 (t, 2H, $J_{\text{HH}}=7.34$ Hz), 1.57-1.40 (m, 9H).

5.2.4 Sintesi del complesso **B**



In un pallone ad un collo si pongono il legante **L2** (0.05g, 0.09 mmol) e il dimero di Iridio **7** (0.04 g, 0.04 mmol, 0.5 eq) poi si aggiungono come solventi CH₂Cl₂ e EtOH in rapporto 3:1 (10 ml). La miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 giorni.

Al termine di questo periodo la miscela è stata portata a secco al rotavapor poi si esegue una precipitazione con MeOH, si conserva la fase liquida nella quale è sciolto il prodotto e si elimina il solido precipitato. La miscela viene portata a secco al rotavapor poi sciolta nuovamente nella minima quantità possibile di MeOH. Infine si precipita il prodotto con Et₂O e lo si filtra con un Büchner.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 45.7%.

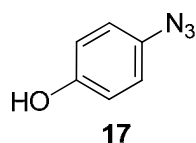
¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 9.62 (s, 1H), 8.28 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=8.2$ Hz), 8.05 (m, 3H), 7.80-7.95 (m, 9H), 7.68 (d, 1H, $J_{\text{HH}}=7.6$ Hz), 7.55 (m, 5H), 7.35-7.40 (m, 1H), 7.05-6.92 (m, 3H), 6.88 (dt, 2H, $J_{\text{HH}}=1$ Hz, $J_{\text{HH}}=7.6$ Hz), 6.73 (t, 1H, $J_{\text{HH}}=7.59$ Hz), 6.15 (dd, 2H, $J_{\text{HH}}=3.00$ Hz), 4.45-4.55 (m, 2H), 3.40-3.50 (m, 1H), 2.90-3.10 (m, 2H), 2.35 (t, 2H, $J_{\text{HH}}=7.34$ Hz), 1.90-1.40 (m, 6H).

^{13}C NMR (DMSO d_6 , 150 MHz) δ 171.83 (C), 167.69 (C), 166.96 (C), 161.67 (C), 150.38 (CH), 149.97 (C), 149.49 (CH), 149.32 (C), 149.26 (C), 146.74 (C), 144.51 (C), 144.46 (C), 141.70 (C), 140.66 (CH), 140.07 (C), 139.30 (CH), 139.20 (CH), 135.01 (CH?), 133.07 (CH?), 131.90 (CH), 131.31 (CH), 130.66 (CH), 129.92 (CH), 127.96 (CH), 127.68 (CH), 127.51 (CH), 125.70 (CH), 125.46 (CH), 124.99 (CH), 124.44 (CH), 124.22 (CH), 123.38 (CH), 122.92 (CH), 122.33 (CH), 121.71 (CH), 120.33 (CH), 119.91 (CH), 70.36 (CH), 59.02 (CH_2), 56.27 (CH), 53.22 (CH), 36.57 (CH_2), 27.09 (CH_2), 25.56 (CH_2), 25.41 (CH_2).

ESI - MS: 1040 (M^+).

5.3 Preparazione del complesso C

5.3.1 Sintesi del 4-azidofenolo

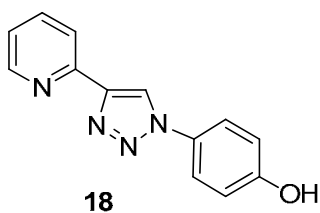


La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁴

In un pallone a due colli munito di agitatore magnetico, il 4-iodofenolo (0.660 g, 3 mmol) è stato disciolto in 6 ml di una soluzione DMSO- H_2O (5:1), in seguito sono stati aggiunti NaN_3 (0.390g, 6 mmol) e sodio ascorbato (0.030 g, 0.15 mmol). Dopo aver fatto gorgogliare N_2 per 15 minuti, sono stati aggiunti CuI (0.057 g, 0.3 mmol) e N,N' -dimetildiammina (48 μl , 0.45 mmol) poi la miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente sotto N_2 .

Dopo 4 ore, quando il complesso di Iodio si è completamente consumato, è stata aggiunta dell'acqua alla miscela (10ml) che poi è stata estratta con etilacetato (3X 10 ml). La fase organica è stata prima anidrificata con MgSO_4 poi portata a secco al rotavapor.

5.3.2 Sintesi del 4-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il) fenolo



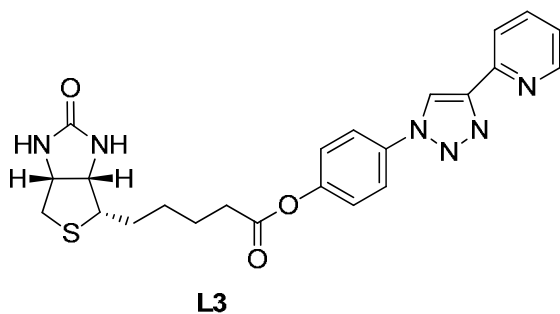
In un pallone a due colli munito di agitatore magnetico, il 4-azidofenolo (3 mmol) è stato disciolto in una miscela *t*-BuOH:H₂O=1:1 (15 ml). In seguito sono stati aggiunti la 2-etinilpiridina (1.1 eq), il sodio ascorbato (0.3 eq) e CuSO₄ (0.05eq). La miscela è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte.

Il giorno seguente il solvente è stato rimosso in vuoto e sono stati aggiunti alla soluzione 20 ml di CH₂Cl₂ e una soluzione acquosa di NH₃. La miscela è stata lasciata sotto agitazione per un'altra notte. Al termine del tempo previsto, la fase acquosa è stata lavata due volte con 10 ml di CH₂Cl₂, la fase organica è stata anidrificata con MgSO₄. In seguito è stato rimosso il solvente e il prodotto grezzo è stato purificato per cromatografia su colonna di silice (CH₂Cl₂/MeOH=95/5).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.95-7.05 (m, 2H), 7.30 (m, 1H), 7.65-7.75 (m, 2H), 7.85 (dt, 1H, *J*_{HH}=7.8, *J*_{HH}=1.7), 8.27 (bd, 1H, *J*_{HH}=8.7), 8.51 (s, 1H), 8.62 (bd, 1H, *J*_{HH}=5.3).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 117.2 (CH), 121.7 (CH), 122.2 (CH), 123.5 (CH), 124.7 (CH), 130.5 (C), 138.9 (CH), 149.5 (C), 150.5 (CH), 150.9 (C), 159.8 (C).

5.3.3 Sintesi del legante L3



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁹

In un pallone a due colli si pongono la biotina (0.04 g, 0.15 mmol, 1 eq), il 4-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)fenolo (0.08 g, 0.30 mmol, 2 eq) e HOBt (0.04 g, 0.30 mmol, 2 eq) poi lo si degasa con una corrente di azoto per 10 minuti. Al termine di

questo periodo si aggiunge la DMF anidra (3 ml) e si lascia la miscela sotto atmosfera inerte per altri 10 minuti. Infine si aggiungono Et₃N (84 µl, 4 eq) e EDCI (0.07 g, 0.38 mmol) e poi lascia sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore.

Il giorno seguente si aggiunge altro EDCI (1.5 eq) e si lascia sotto agitazione per 8 ore.

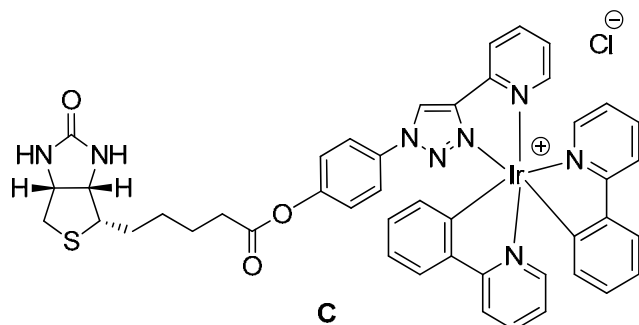
Si elimina la DMF in vuoto poi si sottopone il solido ottenuto a 4 lavaggi con MeOH.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 55.0%.

¹H NMR (DMSO, 400 MHz) δ 9.33 (s, 1H), 8.67 (d, *J*_{HH} = 4.28 Hz, 1H), 8.16 (d, *J*_{HH} = 8.15 Hz, 1H), 8.08 (d, *J*_{HH} = 8.88 Hz, 2H), 7.96 (triplo doppietto, *J*_{HH} = 1.74 Hz, 1H), 7.44-7.37 (m, 3H), δ 6.47 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 4.36-4.30 (m, 1H), 4.20-1.40 (m, 1H), 3.20-3.12 (m, 1H), 2.85 (dd, *J*_{HH} = 5.24 Hz, 1H), 2.67-2.61 (m, 2H), 2.59 (s, 1H), 1.76-1.40 (m, 6H).

¹³C NMR (DMSO d₆, 101 MHz) δ 172.13 (C), 163.17 (C), 150.86 (C), 150.14 (CH), 149.93 (C), 148.68 (C), 137.80 (CH), 134.55 (C), 123.82 (CH), 123.76 (CH), 121.98 (CH), 121.92 (CH), 120.26 (CH), 61.48 (CH), 59.67 (CH), 55.76 (CH), 40.33 (CH₂), 33.74 (CH₂), 28.46 (CH₂), 28.37 (CH₂), 24.78 (CH₂).

5.3.4 Sintesi del complesso C



In un pallone ad un collo si pongono il legante **L3** (0.014 g, 0.030 mmol) e il dimero di Iridio **7** (0.016 g, 0.015 mmol, 0.5 Eq) poi si aggiungono come solventi CH₂Cl₂ e EtOH in rapporto 3:1 (4 ml). La miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 giorni.

Al termine di questo periodo la miscela è stata portata a secco al rotavapor poi ridisciolta nella minima quantità possibile di MeOH e precipitata con Et₂O. Il solido viene separato dalle acque e si ripete la precipitazione un paio di volte. Infine isola il solido e lo si secca.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 60.3%.

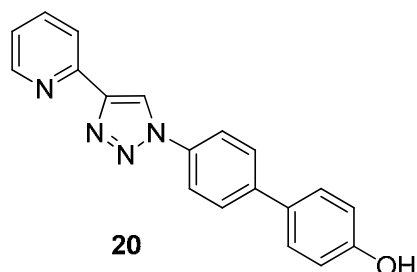
¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 11.6 (s, 1H), 9.33 (d, 1H, *J*_{HH} = 7.68 Hz), 8.10 (d, 2H, *J*_{HH} = 8.56 Hz), 7.99 (t, 1H, *J*_{HH} = 7.70 Hz), 7.84 (d, 2H, *J*_{HH} = 8.23 Hz), 7.70 (d, 4H, *J*_{HH} = 5.76 Hz), 7.60 (m, 2H), 7.43 (d, 1H, *J*_{HH} = 5.69 Hz), 7.25 (m, 3H), 7.00-6.75 (m, 6H), 6.33 (dt, 2H, *J*_{HH} = 7.4 Hz, *J*_{HH} = 5.7 Hz), 4.45 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 3.10 (m, 1H), 2.82 (dd, 1H, *J*_{HH} = 3.97 Hz), 2.67 (d, 1H, *J*_{HH} = 13.03 Hz), 2.45 (t, 2H, *J*_{HH} = 7.41 Hz), 1.70 (m, 4H), 1.43 (t, 2H, *J*_{HH} = 7.66 Hz).

¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 170.70 (C), 167.39 (C), 166.51 (C), 162.57 (C), 150.37 (C), 148.91 (C), 148.86 (C), 148.53 (C), 148.51 (CH), 148.47 (CH), 148.45 (CH), 147.35 (CH), 145.23 (C), 142.71 (C), 142.64 (C), 138.97 (CH), 137.02 (CH), 136.98 (CH), 132.44 (C), 130.93 (CH), 130.70 (CH), 129.68 (CH), 129.01 (CH), 128.72 (CH), 125.83 (CH), 125.15 (CH), 124.29 (CH), 123.67 (CH), 123.31 (CH), 122.33 (CH), 122.23 (8CH), 121.84 (CH), 121.67 (CH), 121.21 (CH), 120.61 (CH), 118.55 (CH), 118.43 (CH), 60.93 (CH), 59.15 (CH), 54.42 (CH), 39.57 (CH₂), 32.80 (CH₂), 27.30 (CH₂), 23.63 (CH₂).

ESI - MS: 965 (M⁺).

5.4 Preparazione del complesso D

5.4.1 Sintesi del 4'-(4-(piridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-[1,1'-bifenil]-4-ol



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁸

I composti 2-(1-(4-bromofenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)piridina (0.150 g, 0.498 mmol) e (4-idrossifenil) acido boronico (0.137 g, 0.996 mmol) sono stati sciolti in THF (5 ml) all'interno di un pallone a due colli. In seguito sono stati aggiunti l'EtOH e la soluzione di K₂CO₃ 2M in acqua (0.6 ml). La miscela è stata poi degassata con una corrente di azoto per 10 minuti. Al termine di questo periodo è stato aggiunto Pd(PPh₃)₄ (1 eq). Infine la miscela di reazione è stata posta sotto agitazione a riflusso a 75°C sotto atmosfera di azoto per tutta la notte.

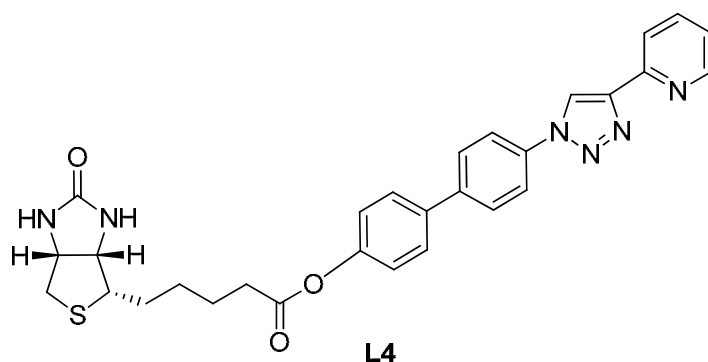
Il giorno seguente è stata effettuata un'estrazione con etilacetato e acqua. La fase organica contenente il prodotto disciolto è stata anidrificata con MgSO_4 . Il prodotto grezzo è stato purificato per cromatografia su colonna di silice ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Etilacetato}=85/15$).

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 35%.

^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 8.64 (m, 2H), 8.28 (d, 1H, $J_{\text{HH}} = 8.23$ Hz), 7.85 (m, 3H), 7.71 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=8.62$ Hz), 7.53 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=8.62$ Hz), 7.96 (d, 2H, $J_{\text{HH}}=8.70$ Hz), 5.82 (bs, 1H).

^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-\text{ACN}-d_3$, 101 MHz) δ : 142.7 (C), 138.5 (C), 133.35 (C), 133.3 (CH), 132.8 (C), 132.7 (CH), 132.6 (CH), 131.9 (C), 130.6 (C), 129.7 (CH), 129.6 (CH), 128.9 (CH), 128.3 (CH), 121.7 (CH), 116.5

5.4.2 Sintesi del legante L4



La metodologia utilizzata è stata adattata da una procedura riportata in letteratura.²⁹

In un pallone a due colli si pongono la biotina (0.017g, 0.068 mmol, 1eq), il 4'-(4-(pyridin-2-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-[1,1'-bifenil]-4-ol (0.032 g, 0.10 mmol, 1.5 eq), HOBt (0.042 g, 0.308 mmol, 2 eq), EDCI·HCl (0.074 g, 0.385 mmol, 2.5 eq), l' Et_3N (0.04 ml, 4 eq), la DMF anidra (3.080 ml) e si lascia degasare per 10 minuti con una corrente di azoto. Al termine di questo periodo si lascia la miscela di reazione sotto agitazione a temperatura ambiente per tutta la notte.

Il giorno seguente si aggiunge altro EDCI·HCl (1.5 Eq) e si lascia agitare per altre 24 ore.

Si elimina il solvente in vuoto e si eseguono lavaggi del solido ottenuto con MeOH.

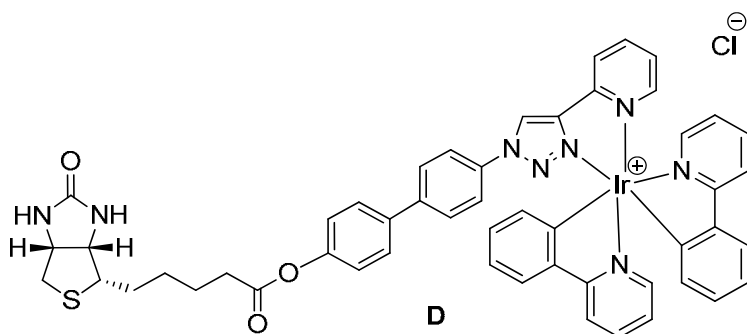
Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 55%.

^1H NMR (DMSO , 400 MHz) δ 9.40 (s, 1H), 8.68 (d, $J_{\text{HH}}=3.98$ Hz, 1H), 8.14 (d, 3H, $J_{\text{HH}}=8.41$ Hz), 7.99-7.91 (m, 3H), 7.82 (d, $J_{\text{HH}}=8.70$ Hz, 2H), 7.42 (t, $J_{\text{HH}} = 6.30$ Hz,

1H), 7.26 (d, $J_{\text{HH}} = 8.62$ Hz, 2H), 6.48 (s, 1H), δ 6.38 (s, 1H), 4.35-4.30 (m, 1H), 4.20-4.14 (m, 1H), 3.20-3.12 (m, 1H), 2.85 (dd, $J_{\text{HH}} = 5.07$ Hz, 1H), 2.65-2.57 (m, 3H), 1.85-1.40 (m, 6H).

^{13}C NMR (DMSO d_6 , 101 MHz) δ 172.2 (C), 163.2 (C), 150.9 (C), 150.1 (CH), 150.0 (C), 148.7 (C), 140.1 (C), 137.8 (CH), 136.78 (C), 136.25 (C), 128.46 (CH), 128.35 (CH), 128.83 (CH), 122.90 (CH), 121.68 (CH), 121.06 (CH), 120.29 (CH), 40.34 (CH₂), 33.80 (CH₂), 28.47 (CH₂), 28.40 (CH₂), 24.85 (CH₂).

5.4.3 Sintesi del complesso D CV20 – complesso Ir



In un pallone ad un collo si pongono il legante **L4** (0.016 g, 0.030 mmol) e il dimero di Iridio **7** (0.016 g, 0.015 mmol, 0.5 eq) poi si aggiungono come solventi CH₂Cl₂ e EtOH in rapporto 3:1 (4 ml). La miscela viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 giorni.

Al termine di questo periodo la miscela è stata portata a secco al rotavapor poi il prodotto è stato purificato mediante colonna cromatografica su silice con miscela eluente CH₂Cl₂/MeOH=90/10.

Il prodotto è stato ottenuto con una resa del 30%.

^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 11.79 (s, 1H), 9.38 (d, 1H), 8.16 (d, $J_{\text{HH}} = 8.51$ Hz, 2H), 8.06 (t, $J_{\text{HH}} = 7.53$ Hz, 1H), 7.92 (dd, $J_{\text{HH}} = 3.66$ Hz, 2H), 7.81-7.73 (m, 4H), 7.70-7.64 (m, 4H), 7.57-7.51 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 7.15 (d, $J_{\text{HH}} = 8.59$ Hz, 2H), 7.07-6.95 (m, 4H), 6.95-6.85 (m, 2H), 6.34 (dd, $J_{\text{HH}} = 2.20$ Hz, 2H), 5.75 (s, 1H), 5.18 (s, 1H), 4.55-4.45 (m, 1H), 4.35-4.30 (m, 1H), 3.22-3.16 (m, 1H), 2.92 (dd, $J_{\text{HH}} = 4.95$ Hz, 1H), 2.75 (d, $J_{\text{HH}} = 12.67$ Hz, 1.90-1.40 (m, 6H).

^{13}C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 171.06 (C), 167.45 (C), 166.57 (C), 162.26 (C), 149.62 (C), 149.04 (C), 148.94 (C), 148.50 (C), 148.47 (CH), 148.42 (CH), 147.38 (CH), 145.32 (C), 142.71 (C), 142.64 (C), 140.59 (C), 147.38 (CH), 145.32 (C), 142.71 (C),

142.64 (C), 140.59 (C), 138.96 (CH), 136.97 (CH), 136.92 (CH), 136.12 (C), 134.28 (C), 130.95 (CH), 130.70 (CH), 129.70 (CH), 129.03 (CH), 127.37 (CH), 127.13 (CH), 125.90 (CH), 125.05 (CH), 125.41 (CH), 123.67 (CH), 123.30 (CH), 122.29 (CH), 121.81 (CH), 121.67 (CH), 121.20 (CH), 121.14 (CH), 119.74 (CH), 118.52 (CH), 118.41 (CH), 60.92 (CH), 59.12 (CH), 54.33 (CH), 39.55 (CH₂), 32.97 (CH₂), 29.68 (CH₂), 27.34 (CH₂), 23.72 (CH₂).

ESI - MS: 1041 (M⁺)

5.5 Titolazioni in emissione

Aliquote (5 µl) del complesso Iridio(III)-biotina (0.55 mM) vengono aggiunte successivamente a una miscela di avidina (3.8 µM) in 2 ml di una soluzione tampone di Na₂SO₄ a pH 7.4 a intervalli di 1 minuto. Si misura l'intensità di emissione della soluzione finchè l'avidina non viene saturata con la biotina presente nel complesso titolante.¹⁵

5.6 Saggio mediante l'utilizzo del colorante HABA

Aliquote (5 µl) del complesso Iridio(III)-biotina (1.1 mM) vengono aggiunte successivamente a una miscela di avidina (7.6 µM) e HABA (0.3 mM) in una soluzione tampone di Na₂SO₄ a pH 7.4 (1 ml) a intervalli di 1 minuto.

Si registrano gli spettri di assorbimento della soluzione e, successivamente si razionalizza il saggio mettendo in grafico il valore $-\Delta\text{Abs}_{500\text{nm}}$ (asse y) in rapporto alle aggiunte del complesso di Ir (III) alla soluzione contenente il complesso HABA-avidina (asse x).¹⁵

6. BIBLIOGRAFIA

- ¹ P. Sharma, S. Brown, G. Walter, S. Santra, and B. Moudgil, *Nanoparticles for bioimaging, Advances in Colloid and Interface Science*, 123, **2006**, 471-485.
- ² R. Weissleder & M. J. Pittet, "Imaging in the era of molecular oncology", *Nature*, 452, 7187, **2008**, 580-589.
- ³ Petty, Howard R, "Fluorescence microscopy: established and emerging methods, experimental strategies, and applications in immunology", *Microscopy research and technique*, 70, 8, **2007**, 687 709.
- ⁴ Rahul P. Bagwe, Xiaojun Zhao, and Weihong Tan, "Bioconjugated Luminescent Nanoparticles for Biological Applications", *Journal of Dispersion. Science and Technology*, 24, 3, **2003**, 453-464.
- ⁵ Y. T. Lim, O. O. Park, and H. T. Jung., "Gold nanolayer-encapsulated silica particles synthesized by surface seeding and shell growing method: near infrared responsive materials", *Journal of Colloid and Interface Science*, 263, 2, **2003**, 449-453.
- ⁶ A. Waggoner, *Methods Enzymol.*, 246, **1995**, 362.
- ⁷ Sabbatici, N. Guardagli, J. M. Lehn, *Coord.Chem.Rev.*, 123, **1993**, 201.
- ⁸ V. Balzani, R. Ballardini, *Photochem. Photobiol.*, 52, **1990**, 409.
- ⁹ F. S. Richardson, *Chem.Rev.*, 82, **1982**, 541-552.
- ¹⁰ S.C. Rasmussen, M.M. Richter, E. Yi, H. Place, K.J. Brewer, *Inorg. Chem.*, 29, **1990**, 3926.
- ¹¹ I. M. Dixon, J.-P. Collin, J.-P. Sauvage, L. Flamigni, S. Encinas, F. Barigelletti, *Chem. Soc. Rev.*, 29, **2000**, 385.
- ¹² J. A. G. Williams, A. J. Wilkinson, V. L. Whittle, *Dalton Trans.*, **2008**, 2081.
- ¹³ D.-L. Ma, W.-L. Wong, W.-H. Chung, F.-Y. Chan, P.-K. So, T.-S. Lai, Z.-Y. Zhou, Y.-C. Leung, K.-Y. Wong, *Angew., Chem. Int. Ed.*, 47, **2008**, 3735.
- ¹⁴ N. M. Green, *Methods Enzymol.*, 184, **1990**, 51-67.
- ¹⁵ K.K.-W. Lo, J.S.-W. Chan, L.-H. Lui, C.-K. Chung, *Organometallics*, 23, **2004**, 3108.
- ¹⁶ V.D. Bock, H. Hiemstra, J. H. van Maarseveen *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 51–68.
- ¹⁷ L. Haiyan, G. Li, W. Junbo, L. Jingwan Patent *US 2011/9628 A1*, **2011**.

- ¹⁸ S. Lamansky, P. Djurovich, D. Murphy, F. Abdel-Razzaq, R. Kwong, I. Tsyba, M. Bortz, B. Mui, R. Bau, M. E. Thompson, *Inorg. Chem.*, 40, **2001**, 1704-1711.
- ¹⁹ L. Herde, J. C. Lambert, C. V. Senoff, *Inorganic Syntheses*, 15, **2007**, 18-20.
- ²⁰ R. Gao, D. G. Ho, B. Hernandez, M. Selke, D. Murphy, P.I. Djurovich, M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, **2002**, 14828-14829.
- ²¹ A. S. Ionkin, W. J. Mashall, B. M. Fish; *Organometallics*, 25, **2006**, 1461-1471.
- ²² A. Auffrant, A. Barbieri, F. Berigelletti, J. Collin, L. Flamini, C. Sabatini, J. Sauvage, *Inorg. Chem.*, 45, **2006**, 10990-10997.
- ²³ Stefan Kappaun, Christian Slugovc, Emil J. W. List, *International Journal of Molecular Sciences*, 9, **2008**, 1527-1547.
- ²⁴ J. Andersen, U. Madsen, F. Björkling, X. Liang, *Synlett.*, 14 **2005**, 2209-2213.
- ²⁵ J. T. Fletcher, B. J. Bumgarner, N. D. Engels D. A. Skoglund, *Organometallics*, 27, **2008**, 5430-5433.
- ²⁶ A. Alaoui, F. Schmidt, M. Amessou, M. Sarr, D. Decaudin, J. Florent, L. Johannes, *Angew. Chem Int. Ed*, 46, **2007**, 6469-6472.
- ²⁷ N. K. Barral, A. D. Moorhouse, J. E. Moses, *Org. Lett.*, 9, **2007**, 1809-1811.
- ²⁸ P. Coppo, E. A. Plummer, L. De Cola, *Chem. Commun.* **2004**, 1774-1775.
- ²⁹ S. G. Davies, D. A. B. Mortimer, A. W. Mulvaney, A. J. Russell, H. Skarphedinsson, A. D. Smith, R. J. Vickers, *Org. Biomol. Chem.*, 6, **2008**, 1625-1634.

7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio infinitamente la Prof.ssa Letizia Sambri come relatrice e il Prof. Stefano Stagni come correlatore per avermi seguito in questi lunghi mesi di tesi, per tutto il tempo che mi hanno dedicato e per tutta la pazienza che hanno avuto.

Ringrazio Andrea e Sara per avermi aiutato tutte le volte che avevo dei dubbi in laboratorio e quando non sapevo usare qualche strumento; un grazie infinito, in particolare, per avermi aiutato con estrema gentilezza e rimanendo sempre sorridenti nonostante le mie infinite domande.

Ringrazio Alice per la sua costante compagnia in laboratorio, per tutte le chiacchiere fatte insieme sui temi più disparati... Dalla chimica, alla musica, alla letteratura.

Un grazie infinito lo devo anche ad Ansa, chi ha studiato costantemente con me per preparare la maggior parte degli esami, e Laura, chi mi ha sostenuto tra lunghe telefonate e mail durante i momenti più bui di questi ultimi anni.

Ringrazio i miei compagni corso, grazie per tutti quei piccoli gesti che hanno reso indimenticabili questi anni. Grazie a chi mi ha aiutato nella preparazione degli esami, grazie chi mi ha spiegato qualcosa che non avevo capito, grazie a tutti quelli che si sono impegnati per preparare le feste di facoltà, grazie a chi mi ha ospitato a Bologna quando si usciva insieme, grazie a chi ha riparato mille volte la mia bici, grazie a chi si fermava a chiacchierare nelle pause e per pranzo... Grazie per tutto!

Ringrazio anche la mia famiglia per avermi permesso di studiare in questi anni e per avermi permesso contemporaneamente di fare anche mille altre esperienze altrettanto indimenticabili.

Grazie a chi ha fatto di tutto per insegnarmi a non arrendermi di fronte alle difficoltà, a chi mi ha insegnato a ragionare per poter trovare una soluzione ai problemi, a chi si è battuto perché non imparassi le cose a memoria, a chi mi ha insegnato a chiedermi dei perché e a trovare una risposta.